

M H



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 9/10, 1/21, 5/10, 15/54, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027	A1	(11) 国際公開番号 WO00/06708 (43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04092 (22) 国際出願日 1999年7月29日(29.07.99) (30) 優先権データ 特願平10/213823 1998年7月29日(29.07.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 成松 久(NARIMATSU, Hisashi)[JP/JP] 〒207-0013 東京都東大和市向原5-1082-1 Tokyo, (JP) 工藤 崇(KUDO, Takashi)[JP/JP] 〒192-0041 東京都八王子市中野上町4-25-28 グリーンツルマキ303 Tokyo, (JP) 佐々木克敏(SASAKI, Katsutoshi)[JP/JP] 〒228-0812 神奈川県相模原市相南2-15-17 レオパレス相南202 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特 許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE (54) 発明の名称 新規ポリペプチド (57) Abstract A novel polypeptide having an α 1,3-fucosyltransferase activity; a process for producing this polypeptide; a DNA encoding this polypeptide; a process for producing this DNA; a recombinant vector obtained by integrating this DNA; a transformant carrying this recombinant vector; an antibody recognizing the above polypeptide; a method for quantitating the above polypeptide and an immunostaining method by using this antibody; a process for producing a fucose-containing sugar chain by using the above polypeptide or the above transformant; a method for screening a substance altering the expression of a gene encoding the above polypeptide; a method for screening a substance altering the activity of the polypeptide; and a method for diagnosing brain diseases, renal diseases, cancer, etc. by using the above DNA or the above antibody.		

(57)要約

本発明は、新規 $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAの製造法、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドまたは該形質転換体を用いたフコース含有糖鎖の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法および該DNAあるいは核抗体を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	HR クロアチア	ML マリ	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TR トルコ
CF 中央アフリカ	ID インドネシア	MR モーリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	IE アイルランド	MW マラウイ	UA ウクライナ
CH スイス	IL イスラエル	MX メキシコ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IN インド	NE ニジェール	US 米国
CM カメルーン	IS アイスランド	NL オランダ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IT イタリア	NO ノールウェー	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国		
DK デンマーク			

明 細 書

新規ポリペプチド

技術分野

本発明は、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドを用いたフコース含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたフコース含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法に関する。

背景技術

フコース含有糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ①～⑥、講談社、（1993年）、Glycobiology, 3, 97（1993）〕。

フコース含有糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

フコース含有糖鎖の一つであるルイスx糖鎖 [Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc] は、初期胚、脳、および腎臓の発生の過程で規則正しく出現する。また、ルイスx糖鎖は互いに親和性を有することや、マウス初期胚の発生過程における細胞緊密化 (cell compaction) に関与することから、ルイス糖鎖が接着分子あるいは糖鎖シグナルとして作用し、初期胚、脳、および腎臓の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。

従って、それらの発生の過程で出現するルイスx糖鎖の合成に関与する $\alpha 1,3$

ーフコース転移酵素の遺伝子をクローン化し、その役割を解析することにより、該遺伝子と遺伝性疾患等との関連を調べることが可能になる。

シアリルルイス x 糖鎖 [NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc]、シアリルルイス a 糖鎖 [NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc]、ルイス x 糖鎖およびルイス y 糖鎖 [Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] は、癌関連糖鎖として知られている。

シアリルルイス a 糖鎖は、主に大腸癌や膵癌等の消化器系の癌において高頻度に検出される。一方、シアリルルイス x 糖鎖、ルイス x 糖鎖、ルイス y 糖鎖は、消化器系癌のほか、肺癌、卵巣癌、腎癌で検出される。

同じ糖鎖が出現する場合でも、該糖鎖の合成に関与する糖転移酵素は、細胞により異なることが明らかになっているため、例えばそれぞれの癌細胞においてルイス x 糖鎖の生合成に関与している α 1, 3-ーフコース転移酵素を同定し、特定の癌との相関を調べることにより、より正確な癌の診断が可能になると推定される。

ルイス x 糖鎖は、該糖鎖を含有する糖タンパク質の血中におけるクリアランスや目的臓器へのターゲティングにも関与している。任意のタンパク質に人為的にルイス x 糖鎖を付加することにより、任意のタンパク質の血中クリアランス速度を制御したり、肝臓へのターゲティングを可能にすることができると考えられる [J. Biol. Chem., 270, 24024-24031(1995)]。

また、ルイス x 糖鎖には、該糖鎖間での相互接着能があることが知られていることから [Glycoconjugate J., 11, 238-248(1994)、Glycobiology, 8, 139-146(1998)]、任意のタンパク質にルイス x 糖鎖を付加することにより、該タンパク質をルイス x 糖鎖を高発現している癌組織へターゲティングできる可能性がある。

一方、タンパク質にシアリルルイス x 糖鎖が付加した場合は、該タンパク質はセレクチンを発現した細胞（例えば炎症部位の血管内皮細胞）へターゲティングされると考えられる。

従って、任意のタンパク質を肝臓や癌組織へ効率よくターゲティングするため

には、タンパク質へ効率よくルイス x 糖鎖を付加させるとともに、シアリルルイス x 糖鎖を付加させないことが望ましい。組換え糖タンパク質の生産に適した宿主細胞（例えばNamalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、CHO細胞等）において、任意の組換え糖タンパク質に、シアリルルイス x 糖鎖を付加させることなく、ルイス x 糖鎖を効率よく付加させる方法の開発は、産業上重要な課題である。

これまでに、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (F u c - T I V) を特定のCHO細胞株に発現させると、シアリルルイス x 糖鎖の発現なしに、ルイス x 糖鎖が発現することが報告されている [J. Biol. Chem., 266, 17467-17477(1991)、J. Biol. Chem., 266, 21777-21783(1991)]。しかし、F u c - T I Vは本来シアリルルイス x 糖鎖を合成する活性を有しているために、他の細胞（例えば別のCHO細胞株やNamalwa KJM-1細胞）にF u c - T I Vを発現させた場合には、ルイス x 糖鎖に加えてシアリルルイス x 糖鎖が発現する [Cell., 63, 1349-1356、J. Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)]。

導入する細胞により、F u c - T I Vによるシアリルルイス x 糖鎖の合成量が異なる原因としては、これら細胞中に存在する基質となる糖鎖の量や質が異なること、および発現させたF u c - T I Vや他の糖転移酵素（例えば $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素）の発現量がこれら細胞で異なること等をあげることができる。

例えば、 $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素 (ST3Gal IIIあるいはST3Gal IV) とF u c - T I Vは同じ基質 (N-アセチルラクトサミン構造を有する糖鎖) に対して競合すると考えられる。

$\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素の活性がF u c - T I Vに比べて相対的に強ければ、優先的に $\alpha 2,3$ -シアリルN-アセチルラクトサミン糖鎖ができ、F u c - T I Vにより該糖鎖にフコースが付加されシアリルルイス x 糖鎖が合成されるが、F u c - T I Vの活性が相対的に強ければフコシルN-アセチルラクトサミン糖鎖 (ルイス x 糖鎖) が優先的に合成される。 $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素はルイス x 糖鎖にシアル酸を付加する活性が弱いいため、 $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素による

シアリルルイス x 糖鎖の合成は行われにくい。

一方、ルイス x 糖鎖を合成する活性は有するが、シアリルルイス x 糖鎖を合成する活性を持たない新規な $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素が取得できれば、宿主細胞中でその酵素を発現させることにより、シアリルルイス x 糖鎖を合成することなく、ルイス x 糖鎖を効率よく合成することが可能と考えられる。物質生産に適した細胞を含む多くの細胞は、ルイス x 糖鎖の前駆体である N-アセチルラクトサミン構造を有している。従って、該新規酵素が取得できれば、多くの細胞を宿主として、シアリルルイス x 糖鎖を合成することなく、ルイス x 糖鎖を効率よく合成することが可能となる。しかしながら、これまでにこのような酵素は知られていない。

ルイス x 糖鎖を認識する抗体である抗 CD 15 抗体は、先体反応後のヒト精子と結合し、精子と卵子の相互作用を阻害することから、ルイス x 糖鎖は受精において重要な役割を果たしていると推定される [American Journal of Reproductive Immunology, 37, 172-183 (1997)]。従って、ヒト精子上のルイス x 糖鎖の生合成に関与している $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素を同定し、不妊症との関連を調べることは、不妊症の診断や治療に有用であり、ルイス x 糖鎖またはルイス x 糖鎖が付加したタンパク質を用いて、安全で確実な非妊法が確立できる可能性もある。

従って、この目的においても、任意のタンパク質にルイス x 糖鎖を効率よく付加させる方法の開発は重要な課題である。

白血球の炎症部位への集積やリンパ球のリンパ節へのホーミングには、接着分子セ렉チン (E-, P-, および L-セ렉チン) とその糖鎖リガンド (シアリルルイス x 糖鎖またはその関連糖鎖) の接着が関与していることが明らかとなっている。

シアリルルイス x 糖鎖およびその構造異性体であるシアリルルイス a 糖鎖は、癌化に伴って発現量が増加する癌関連抗原としても知られており、これらの糖鎖に対する抗体は癌の血清診断に利用されている。

これらの糖鎖がセレクトインと結合することから、これらの糖鎖は癌の転移にも関与すると考えられている。最近、マウスの腎臓に存在するルイスx糖鎖を含有する糖脂質が、E-セレクトインと強く結合することが明らかにされた [Biochem. Biophys. Res. Commun., 218, 610-615(1996)]。

セレクトインに強い結合能を有する糖鎖は、セレクトインアンタゴニストとして、炎症や癌転移の治療および予防に有用である。従って、マウス腎臓で発現している $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素は、セレクトインアンタゴニストの効率的合成に利用可能と推定され、該酵素の同定と生産は重要と考えられるが、これまでに、該酵素は同定されていない。

これまでに5種類の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (Fuc-T I I I、Fuc-T I V、Fuc-TV、Fuc-T V I、Fuc-T V I I) の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている [Kukowska-Latalloら: Genes & Dev. 4, 1288-1303 (1990)、Goelzら: Cell 63, 1349-1356(1990)、Loweら: J. Biol. Chem. 266, 17467-17477(1991)、Kumarら: J. Biol. Chem. 266, 21777-21783(1991)、Westonら: J. Biol. Chem. 267, 4152-4160(1992)、Westonら: J. Biol. Chem. 267, 24575-24584(1992)、Koszdinら: Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 152-157(1992)、Sasakiら: J. Biol. Chem. 269, 14730-14737(1994)、Natsukaら: J. Biol. Chem. 269, 16789-16794(1994)]。

Fuc-T I I Iは、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性と $\alpha 1,4$ -フコース転移酵素を有し、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖、シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖 [Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc]、およびルイスb糖鎖 [Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc] を合成可能である (ルイスa糖鎖およびルイスb糖鎖を合成する活性が強い)。

Fuc-T I Vは、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、およびルイスy糖鎖を合成可能である (ルイスx糖鎖およびルイスy糖鎖を合成する活性が強い)。

Fuc-TVは、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、およびルイスy糖鎖

を合成可能である。

Fuc-TVIは、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖を合成可能である。

Fuc-TVIIは、シアリルルイスx糖鎖のみ合成可能である。

上述のように、クローン化された5種の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素は、一部重複した受容基質特異性を示すが、厳密にはそれぞれ異なる受容基質特異性を示す。また、それぞれの酵素は、細胞特異的あるいは時期特異的に発現し、1つの細胞に複数の酵素が同時に発現する場合のあることが明らかとなっている。これらの酵素は、類似の構造を有するフコース含有糖鎖を合成可能であるが、発現する細胞や発現する時期が異なることから、それぞれ別々の機能を担っていると考えられる。

細胞や組織の抽出液を酵素源とした酵素学的解析により、該組織や該細胞で発現している $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を特定することはある程度可能である (Molliconeら : Carbohydrate Research, 228, 265-276 (1992)、Westonら : J. Biol. Chem., 267, 24575-24584 (1992))。しかし、該酵素学的解析では、複数の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を発現している細胞や組織において発現している $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素各々を特定すること、ならびにそれらの $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素各々についての酵素学的特性を明らかにすることはできない。

特定の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の発現を検出するためには、特異的抗体を用いた免疫的検出法か、遺伝子の塩基配列に基づいた検出法 (例えばノーザンハイブリダイゼーション法やPCR法) を用いる必要がある。

発明の開示

本発明は、新規な $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および脳疾患、腎疾患、または癌等の疾患の診断法を提供すること

を目的とする。

本発明は、以下の(1)～(50)に関する。

(1) 糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン(以下、GlcNAcと略す)残基に α 1,3結合でフコース(以下、F u cと略すこともある)を転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する α 2,3-シアリルN-アセチルラクトサミン (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のGlcNAc残基に α 1,3結合でF u cを転移する活性を有しないポリペプチド。

(2) 以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号1または2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1または2記載のアミノ酸配列の56番目から359番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) (a)または(b)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のGlcNAc残基に α 1,3結合でF u cを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する α 2,3-シアリルN-アセチルラクトサミン (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のGlcNAc残基に α 1,3結合でF u cを転移する活性を有しないポリペプチド。

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ新規 α 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュ

ラー・バイオロジー サプリメント 1~38、Nucleic Acids Research, 10, 64 87 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci US A, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

(3) 糖鎖の非還元末端に存在するGal β 1-4GlcNAc構造中のGlcNAc残基に α 1,3結合でFucを転移する活性がルイスx糖鎖 [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] およびルイスy糖鎖 [Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] を合成する活性であり、糖鎖の非還元末端に存在するNeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc構造中のGlcNAc残基に α 1,3結合でFucを転移する活性がシアリルルイスx糖鎖 [NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] を合成する活性である、上記(1)または(2)のポリペプチド。

(4) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)から選ばれるDNA。

(a) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA。

(b) 配列番号3で表される塩基配列の280から1194番目の塩基配列を有するDNA。

(c) 配列番号3で表される塩基配列の115から1194番目の塩基配列を有するDNA。

(d) 配列番号4で表される塩基配列の1454から2368番目の塩基配列を有するDNA。

(e) 配列番号4で表される塩基配列の1289から2368番目の塩基配列を有するDNA。

(f) 配列番号5で表される塩基配列の460から1374番目の塩基配列を

有するDNA。

(g) 配列番号5で表される塩基配列の295から1374番目の塩基配列を有するDNA。

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)および(g)のDNAから選ばれるDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAであり、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する α 2,3-シアリルN-アセチラクトサミン (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチドをコードするDNA。

上記の「ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)および(g)のDNAから選ばれるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロト

コールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント 1～38 と略記する)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号 1 または 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは 80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは 95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

(5) 上記 (4) のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(6) 組換え体DNAが、プラスミド pAMo-mFT9 またはプラスミド pBS-hFT9 (S2) である、上記 (5) の組換え体DNA。

(7) 上記 (5) または (6) の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(8) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物から選ばれる形質転換体である、上記 (7) の形質転換体。

(9) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記 (8) の形質転換体。

(10) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、上記 (8) の形質転換体。

(11) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusiaの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、上記 (8) の形質転換体。

(12) 上記 (1)、(2) および (3) のポリペプチドから選ばれるポリペプ

チドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(13) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(14) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(13)の製造法。

(15) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(16) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該タンパク質を合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(17) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc)、 ii) N-アセチルラクトサミン構造を非還元末端に有するオリゴ糖、 iii) N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、 iv) それらのN-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体、 およびv) それらのN-アセチルラクトサミ

ン構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該N-アセチルラクトサミン構造中のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) グアノシン5'-ニリン酸フコース (以下、GDP-Fucと略す) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルラクトサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

(18) 誘導体が、Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\alpha 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\alpha 1-3$ (Fuc $\alpha 1-2$)Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、GalNAc $\alpha 1-3$ (Fuc $\alpha 1-2$)Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\alpha 1-4$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc(6SO₃⁻)、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、上記(17)記載の製造法。

(19) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i)ラクトース (Gal $\beta 1-4$ Glc)、ii)ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii)ラクトース構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、iv)それらのラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体、およびv)それらのラクトース構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該ラクトース構造中のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) GDP-Fucを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のラクトースのグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

(20) 誘導体が、Gal α 1-3Gal β 1-4Glc、Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc、GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc、Gal α 1-4Gal β 1-4Glc、Gal β 1-4Glc(6SO₃⁻)、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、上記(19)記載の製造法。

(21) 上記(8)の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にFucが α 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該複合糖質を採取することを特徴とする、該複合糖質の製造法。

(22) 上記(8)の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、Fucが α 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該複合糖質を採取することを特徴とする、該複合糖質の製造法。

(23) 上記(8)のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、Fucが α 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該複合糖質を採取することを特徴とする、該複合糖質の製造法。

(24) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リボ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、上記(17)～(23)のいずれか一つに記載の製造法。

(25) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(22)の製造法。

(26) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプ

チドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(27) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAの有する塩基配列中の連続した10～50塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

(28) 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC - 5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC - 5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC - 5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O - プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、上記(27)のオリゴヌクレオチド。

(29) 上記(27)または(28)のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(30) 上記(26)または(29)の方法を用いた、脳疾患、腎疾患または癌の検出法。

(31) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAを用い、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドをコードするDNAの転写を抑制する方法。

(32) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAを用い、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

(33) 上記(27)または(28)のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドをコードするDNAの転写を抑制する方法。

(34) 上記(27)または(28)のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

(35) 上記(31)～(34)のいずれか一つに記載の方法を用いた、腎疾患または癌の治療法。

(36) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを認識する抗体。

(37) 上記(36)の抗体を用いる、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドの免疫学的検出法。

(38) 上記(36)の抗体を用い、上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

(39) 上記(36)の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

(40) 上記(36)の抗体を含有する、脳疾患、腎疾患または癌の診断薬。

(41) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法。

(42) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗ルイスx抗体または抗ルイスy抗体を用い、ルイスx糖鎖含量またはルイスy糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(43) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(36)の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(44) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(45) プロモーターDNAが、神経細胞、腎細胞、胃上皮細胞、白血球細胞、脳腫瘍細胞、神経芽細胞腫細胞、メラノーマ細胞、腎癌細胞、胃癌細胞、大腸癌細胞、および膀胱癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(44)のプロモーターDNA。

(46) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、上記(44)または(45)のプロモーターDNA。

(47) 上記(44)、(45)および(46)のプロモーターDNAから選ばれるプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含むプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(48) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、上記(47)のスクリーニング法。

(49) 上記(1)、(2)および(3)のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト非ヒト動物。

(50) ノックアウト非ヒト動物がマウスである、上記(49)のノックアウト非ヒト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1)新規 α 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA(以下、新規 α 1,3-フコース転移酵素遺伝子と略すこともある)の取得並びに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を発現している細胞より、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等があげられる。

ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を発現している細胞としては、ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を発現している細胞であればいかなる細胞でも用いることができ、例えば、マウスやヒトの脳、腎臓、胃、膀胱、精巣等の組織、マウスF9細胞、ヒト神経芽細胞腫細胞株等を用いることができる。

cDNAライブラリーを作成するための、クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、 λ zap II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA クローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T3 18U (ファルマシア社製)、pCD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]、pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLR™ Strain [ストラタジーン社より市販] および E. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等が用いられる。

cDNAライブラリーとして、例えば以下のようにして作製したcDNAライブラリーをあげることができる。

マウス脳由来のmRNAよりGIBCO BRL社製のcDNA合成システム(cDNA Synthesis System) キットを用いてcDNAを合成する。

該DNAの両末端にSfiIリンカーを付与した後、クローニングベクターp

AMoのSfiI部位に挿入したプラスミドを作製する。

該プラスミドを用い、*E. coli* LE392を形質転換してcDNAライブラリーを作成する。

作成したcDNAライブラリーより目的とするDNAを含むクローンを以下の方法で選択する。

上記で作成したcDNAライブラリーから、常法あるいはキアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである/plasmid/maxi kit (商品番号 41031) 等のキットを用いてプラスミドを調製する。

pAMoは、動物細胞用の発現ベクターであり、該プラスミドを用いて作製したcDNAライブラリーは、そのまま以後の操作に利用することができる。

もし発現ベクター以外のベクターでcDNAライブラリーを作製した時には、該cDNAライブラリーより挿入cDNAを切り出し、動物細胞あるいは昆虫細胞で発現可能な発現ベクターに組み込み直す必要がある。

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、p cDNA I/Amp、p cDNA I、p CDM 8 (いずれもフナコシ社より市販)、p AGE 107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p REP 4 (インビトロジェン社製)、p AGE 103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名p AMo P R S A (特開平05-336963)]、p A S 3-3 (特開平2-227075)、pVL1392 (インビトロジェン社製)、pVL1393 (インビトロジェン社製)、pBlueBacIII (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞あるいは昆虫細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現ベクターの導入方法としては、動物細胞あるいは昆虫細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーショ

ン法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、およびBaculovirus Expression Vectors, W.H. Freeman and Company, New York (1992)、Molecular Biology, A Laboratory Manual, Current Protocols in Molecular Biology, Bio/Technology, 6, 47 (1988)、Virology, 52, 456 (1973)等に記載の方法をあげることができる。

動物細胞としては、ヒトの細胞であるNamalwa細胞、Namalwa細胞のサブラインであるNamalwa KJM-1細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)等をあげることができ、好ましくは、Namalwa細胞またはNamalwa KJM-1細胞をあげることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般

に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンゲン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell 1400、ExCell 1405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium〔Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

pH 6～7、培養温度 25～30℃がよく、培養時間は、通常1～5日間である。

また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

該培養により得られた細胞を、抗ルイスx糖鎖抗体または抗ルイスy糖鎖抗体を用いて蛍光染色した後、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACSと略記する) を利用して、上記抗体の結合量が増加した細胞を濃縮分離する。

ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖に対する抗体としては、ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖と反応する抗体であれば、いかなるものでも用いることができ、例えば、抗ルイスx糖鎖抗体である73-30〔生化学工業社製〕やPM-81、あるいは抗ルイスy糖鎖抗体であるAH-6〔大塚社製〕をあげることができる。また、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖上のルイスx糖鎖を認識するSSEA-1抗体を使用することもできる。

このようにして濃縮分離された細胞から公知の方法、例えば、ハート法〔Mol. Cell. Biol., 8, 2837 (1988)〕により、本発明のDNAを含むプラスミドを回収し、該DNAを含むDNA断片を取得することができる。

本発明のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-mFT9をあげることができる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第2版等に記載

の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサングー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは373A・DNAシーケンサー [パーキン・エルマー (Perkin Elmer) 社製] 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1で表されるペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

該DNAとして、例えば、配列番号2で表されるペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号4あるいは5で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号5のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pBS-hFT9(S2)をあげることができる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

また、後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略記する) [モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press (1990)]等を行うこと

によっても、目的とするDNAを調製することができる。

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法あるいはDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した10～50塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号3、4または5で表される塩基配列中の連続した10～50塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度（ T_m ）および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC - 5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC - 5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC - 5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O - プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌ

クレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

(2) 新規 α 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドの製造

上記の方法により得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38等に記載された方法等を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、新規 α 1,3-フコース転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規 α 1,3-フコース転移酵素遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規 α 1,3-フコース転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBT_{rp}2、pBT_{ac}1、pBT_{ac}2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、p

KYP 10 (特開昭58-110600)、pKYP 200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社) 等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター (P_{lac})、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター (P_{trp} x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-

Blue, Escherichia coli DH1, Escherichia coli MC1000, Escherichia coli KY 3276, Escherichia coli W1485, Escherichia coli JM109, Escherichia coli H B101, Escherichia coli No.49, Escherichia coli W3110, Escherichia coli N Y49, Serratia ficaria, Serratia fonticola, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14067, Corynebacterium glutamicum ATCC13869, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354, Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クリベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげる

ことができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163(1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNA I /Amp、p cDNA I、p CDM8、p AGE 107、p REP4、p AGE 103、p AMo、p AMoA、p AS3-3等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus) のロング・ターミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repeat Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞と

してはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38 (Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (すべてインビトロジェン社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じてポリペプチドを生産することができる。

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

宿主細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法等をあげることができる。

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする新規 α 1,3-フコース転移

酵素活性を有するポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度

は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmingen) 社製]、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell 400、ExCell 405 [いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を

用いることができる。

pH 6～7、培養温度 25～30℃がよく、培養時間は、通常 1～5 日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発現させることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプ 2 型の膜タンパク質のトポロジーを有し、N 末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N 末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

本発明の新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の構造も、他の糖転移酵素と同様の構造を有していた。すなわち、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素は、N 末端の 10 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 20 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 25 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなると考えられた。他の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見 [J. Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)、J. Biol. Chem., 270, 8712-8722(1995)、Glycobiology, 7, 921-927(1997)] を基に、幹領域は少なくとも 25 アミノ酸からなると予想された。したがって、56 番目から 359 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

上記のポリペプチド全長または $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有する領域（触媒領域）を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)〕。

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

具体的には、触媒部位を含むと考えられる56番目から359番目までのアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることが

できると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。精製・検出用のタグとしては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫、実験医学、13, 469-474 (1995)〕。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。

例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製)等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

また、通常の糖転移酵素の精製方法 [J. Evan. Sadler ら：メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 83, 458] に準じて精製できる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる [山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)]。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

また、公知の方法 [J. Biomolecular NMR, 6, 129-134, Science, 242, 1162-1164, J. Biochem., 110, 166-168 (1991)] に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて本発明の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を生産することができる。

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテック社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

本発明の新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドの $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性は、公知の測定法 [Methods in Enzymology, 83, 458, Methods in Enzymology, 179, 397, J. Biol. Chem., 269, 14730-14737 (1994)、特開平06-823021] に準じて測定することができる。

(3) Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造

上記(2)で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にFucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することにより、該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基に付加した構造を有する糖鎖として、ルイスx構造を含有する糖鎖、ルイスy構造を含有する糖鎖等をあげることができる。

培養は上記（２）に準じて行うことができる。

上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質（例えば医薬用組換え糖タンパク質）を、糖鎖合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質にFucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

また、上記（２）で取得した動物個体または植物個体を用い、上記（２）の方法に準じて、Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、Fucが $\alpha 1,3$ 結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

上記（２）記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中でN-アセチラクトサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

即ち、N-アセチラクトサミン（Gal β 1-4GlcNAc）、N-アセチラクトサ

ミン構造を非還元末端に有するオリゴ糖、N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、それらのN-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体、それらのN-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体でありかつ該N-アセチルラクトサミン構造のガラクトース残基に $\alpha 2, 3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体等を受容基質として、上記

(2) 記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびGDP-Fucを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルラクトサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1, 3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

酵素源は、ラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を基質として、37°Cで1分間に1 μ モルのラクト-N-フコペンタオースIII [Lacto-N-fucopentaose III, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc] を生成することのできる活性を1単位 (U) として、0.1mU / 1 ~ 10,000U / 1 であり、好ましくは1mU / 1 ~ 1,000U / 1 の濃度で用いる。

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。また、上記(2)記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記(2)記載の非ヒトトランスジェニック動物より得られたミルクを水性媒体として用いることもできる。

水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン (例えばナイミンS-215、日本油脂社製) などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド (例

例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製)などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン(例えば三級アミンFB、日本油脂社製)などの三級アミン類など、Fuc含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1~50g/lの濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1~50ml/lの濃度で用いられる。

UDP-Fucとしては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。

該UDP-Fucは0.1~500mMの濃度で用いることができる。

上記において、N-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体あるいはN-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該N-アセチルラクトサミン構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体として、 $\text{Fuc } \alpha 1-2\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-3(\text{Fuc } \alpha 1-2)\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{GalNAc } \alpha 1-3(\text{Fuc } \alpha 1-2)\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{SO}_3^-)$ 、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、該糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

受容基質は0.01~500mMの濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じて MnCl_2 等の無機塩、 β -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

生成反応は水性媒体中、pH5~10、好ましくはpH6~8、20~50℃の条件で1~96時間行う。

また、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中でラクトース構造中のグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

即ち、ラクトース ($\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$)、ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、ラクトース構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、それらのラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体、それらのラクトース構造が糖で修飾された誘導体でありかつ該ラクトース構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体等を受容基質として、上記 (2) 記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源および GDP-Fuc を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のラクトース構造中のグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合で Fuc が付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

上記においてラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体あるいはラクトース構造が糖で修飾された誘導体でありかつ該ラクトース構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体として、 $\text{Gal } \alpha 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-3(\text{Fuc } \alpha 1-2)\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{GalNAc } \alpha 1-3(\text{Fuc } \alpha 1-2)\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}(6\text{SO}_3^-)$ 、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、該糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

生成反応は、受容基質の種類を変える以外、上記受容基質の N -アセチルラクトサミン構造中の GlcNAc 残基に $\alpha 1,3$ 結合で Fuc が付与された反応産物を生成させる反応条件と同じ条件で行うことができる。

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編、続生化学実験講座、第4巻、複合糖質研究法 I, II, 東京化学同人, (1986年)、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修, グリコバイオロジー実験プロトコール, 秀潤社, (1996年)〕。

(4) 本発明の DNA またはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等へ

の利用

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕を用いた脳疾患、腎疾患、または癌等の疾病の治療、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いたそれら疾病の診断に利用することが可能である。

例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

即ち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を定量することができる。

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993年)〕を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。

例えば、ヒトの神経細胞、腎臓細胞、胃上皮細胞、白血球細胞、脳腫瘍細胞、神経芽細胞腫細胞、メラノーマ細胞、腎臓癌細胞、胃癌細胞、大腸癌細胞、または膵臓癌細胞で、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング法

に利用することができる。

(5) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(2)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(i i) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1, 200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（以下、P3-U1と略す）[Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン（1.5 mM）、2-メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} M）、ジェンタマイシン（10 μ g/ml）および牛胎児血清（FCS）（CSL社製、10%）を加えた培地（以下、正常培地という）に、さらに8-アザグアニン（15 μ g/ml）を加えた培地で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはP

BS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞 = 5～10：1になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2 mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 mlを混合した溶液を0.2～1 ml添加し、更に1～2分間毎にMEM培地 1～2 mlを数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が50 mlになるように調製する。

該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン (1.5×10^{-5} M) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M)を加えた培地〕100 ml中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ l/穴ずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)]等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロ

ブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（Pristane）0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(6) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを検出することができる。具体的にはマイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

(b) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現する細胞の免疫組織染色に利用できる。

(c) 本発明の抗体を用いて、脳疾患、腎疾患または癌等の疾病の診断に利用することができる。

(7) スクリーニング法への応用。

本発明のポリペプチドは、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有することから、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるルイス x 糖鎖、ルイス y 糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の合成量を増加または低下させることが可能である。

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞におけるルイス x 糖鎖、ルイス y 糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の合成量を制御することが可能である。

上記化合物は、脳疾患、腎疾患、または癌等の疾病の治療や、ルイス x 糖鎖、ルイス y 糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の合成に有用と考えられる。

該化合物は、以下(a)～(e)に示す方法により取得可能である。

(a) 上記(2)で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチド(精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清)を酵素として用い、被験試料の存在下、公知の方法 [Methods in Enzymology, 83, 458, Methods in Enzymology, 179, 397, J. Biol. Chem., 269, 14730-14737 (1994)、特開平06-823021] を用いて $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を測定し、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

(b) 本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記(2)で記載した形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のルイス x 糖鎖、ルイス y 糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の量をそれぞれの糖鎖に対する抗体を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

上記抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(5)で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする遺伝子転写産物の量を、上記(4)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

(e) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(2)記載の動物細胞に、上記(2)記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得する。該形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993)、Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グ

リーン・フルオレッセント・プロテイン (GFP) 遺伝子等をあげることができる。

(8) ノックアウト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、Nature, 350, 6315, 243 (1991)〕。

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト動物)を得ることができる。

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 7, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を

欠失させた例 [Science, 278, 5335, (1997)] が知られている。

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。

従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願（特願平10-213823）の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

第1図は、コントロールプラスミド (pAMo)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pAMo-mFT9)、マウスFuc-TIV発現プラスミド (pAMo-mFT4)、あるいはヒトFuc-TVI発現プラスミド (pAMo-hFT6) を導入したNamalwa細胞について、抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81、73-30)、抗ルイスy糖鎖抗体 (AH-6)、または抗シアリルルイスx糖鎖抗体 (KM93) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、コントロールプラスミドを導入したNamalwa細胞のものである。

第2図は、コントロールプラスミド (pAMo)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pAMo-mFT9)、ヒトFuc-TIV発現プラスミド (pAMo-FT4)、あるいはヒトFuc-TVII発現プラスミド (pAMo-FT7) を導入したNamalwa KJM-1細胞について、抗シアリルルイスx糖鎖抗体 (CS

LEX-1, KM93) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。コントロールは、一次抗体の代わりにA-PBSを使用したもの。

第3図は、コントロールプラスミド (pCDM8)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pCDM8-mFT9)、またはヒトFuc-TIII発現プラスミド (pCDM8-Le) を導入したCOS-1細胞細胞について、抗Lewis a糖鎖抗体 (7LE) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、コントロールプラスミドを導入したCOS-1細胞のものである。

第4図は、マウスFuc-TIX転写物の発現分布を調べるために、マウスの各組織由来のPoly (A)⁺RNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示した電気泳動の図である。シグナルがみられた脳と腎臓についてのみ結果を示す。

第5図は、定量的RT-PCR法を用いて、マウスの各組織におけるマウスFuc-TIX転写物の発現量を調べた結果を示した図である。

比較のために、マウスFuc-TIX転写物およびマウス β -アクチン転写物についても同様に示した。

A. はRT-PCR後のサンプルを、アガロースゲル電気泳動に供した時のパターンを示した電気泳動の図である (a. はFuc-TIX転写物、b. はFuc-TIV転写物の発現量を調べたものである)。

それぞれのゲルでみられる下のバンドが内部コントロール由来のバンド、上のバンドがFuc-TIX転写物またはFuc-TIV転写物由来のバンドである。スタンダードプラスミドを用いて検量線を作成し、マウスFuc-TIX転写物、マウスFuc-TIV転写物、およびマウス β -アクチン転写物の発現量をそれぞれ数値化した図をB. に示した。発現量は、本文中に記載した方法で作製した一本鎖cDNA溶液1 μ l 中での発現量である。

検量線を作成するために用いたスタンダードプラスミドの量をスタンダードDNAとしてA.中に示した。(1)は40fg、(2)は20fg、(3)は10fg、(4)は5fg、(5)は2.5fg、(6)は1.25fgである。

第6図は、マウスFuc-TIX転写物の発現分布を調べるために、マウスの脳組織の切片に対してin situハイブリダイゼーションを行った結果を示した写真である。ここに示した結果は、配列番号20および21に示したプライマーを使用して作製したプローブを用いた時のものである。アンチセンスプローブを用いた時には、神経細胞体でFuc-TIX転写物の発現がみられた(A)。一方、ネガティブコントロールとしてセンスプローブを用いた時には、シグナルはみられなかった(B)。

第7図は、プラスミドpBS-hFT9(S2)の構造を示す。

図中のcDNAおよびApは、それぞれヒトFuc-TIX cDNAおよびアンピシリン耐性遺伝子を表わしている。

第8図は、ターゲティングベクターpFut9F[tkneo]の構造を示した図である。比較のため、Fuc-TIX遺伝子をサブクローン化したプラスミドであるpFut9WT-129の構造を合わせて示す。四角で囲んだ領域の説明は図中に示したとおりである。黒の太線は、Fuc-TIX遺伝子のイントロン2の一部とFuc-TIX遺伝子の下流の染色体遺伝子を示している。黒の細線はpBluescript SK-部分を示している。図中5'UTRは5'非翻訳領域を、3'UTRは3'非翻訳領域を示している。PCRに使用したプライマーの名前と対応する位置を図中に示す。

第9図は、マウスFuc-TIX遺伝子の構造を示した図である。ファージクローンλMFT9-11、λMFT9-25、およびλMFT9-31が含むマウスFuc-TIX遺伝子部分を合わせて示す。図中のBはBamHI部位、SpはSpeI部位、SaはSacI部位を示している。

第10図は、マウス第4染色体上におけるマウスFuc-TIX遺伝子(図中Fut9として示す)の位置を示した図である。他のマーカー遺伝子の位置も合わせて示す。図はマウス第4染色体の一部のみ示してある。

第11図は、ターゲティングベクターpFut9F[tkneo]の造成過程を示した図である。

第12図は、ヘテロマウス同士を交配させて得たマウス個体の遺伝子型を解析した結果の一例を示した電気泳動の図である。Mは分子量マーカを、1～7は各マウスの遺伝子型の解析結果を示す。

第13図は、Fuc-TIXの反応特異性をHPLCで解析した結果を示した図である。Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB（図中Sで示す）に、Fuc-TIV発現細胞（b）またはFuc-TIX（c）発現細胞の抽出液を酵素源として加えて反応後、HPLCを用いて生産物の検出を行った結果を示した。（a）は、コントロールベクターを導入した細胞の抽出液を用いて反応した結果を示した。

第14図は、Fuc-TIXと基質Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2ABとを反応させ、得られた生産物（P1、P2およびP3）をHPLCで解析した結果を示した図である。分子量マーカとして用いた、2-アミノベンズアミド（2-aminobenzamide）で蛍光標識したグルコースホモポリマーの溶出位置を図上部に示した。該グルコースホモポリマーのグルコースユニットをg.u.と略して記載した。（a）P1、（b）P2および（c）P3をJack bean β -galactosidaseでそれぞれ処理し、得られた生産物をHPLCで解析した〔それぞれ（d）、（e）、（f）〕。

第15図は、生産物（P1、P2およびP3）を各種グリコシダーゼで処理し、得られた生成物をHPLCで解析した結果を示した図である。（a）はP1を解析した結果を、（b）はP1をalmond meal α 1,3/4-fucosidaseで処理して得られる生産物を解析した結果を、（c）は基質Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB（図中Sで示す）を解析した結果を、（d）はP2を解析した結果を、（e）はP2をalmond meal α 1,3/4-fucosidaseで処理して得られる生産物を解析した結果を、（f）はP2をJack bean β -galactosidaseで処理して得られる生産物を解析した結果を、（g）はP2をJack bean β -galactosidaseで処理後Jack bean β -N-acetylhexosaminidaseで処理して得られる生産物を解析した結果を、（h）はP2をJack bean β -galactosidase、Jack bean β -N-ace

tylhexosaminidaseで処理後almond meal α 1,3/4-fucosidaseで処理して得られる生産物を解析した結果を、(i)はGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2ABを解析した結果を、(j)はP3を解析した結果を、(k)はP3をalmond meal α 1,3/4-fucosidaseで処理して得られる生産物を解析した結果を表す。

第16図は、コントロールベクター、ヒトFuc-TIV発現プラスミド、またはヒトFuc-TIX発現プラスミドを導入したNamalwa細胞について、抗VIM2糖鎖抗体(図中VIM-2と表記)、Le^x糖鎖抗体[73-30(図中73-30と表記)または抗CD15抗体(図中CD15 Dakoと表記)]を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。黒の細線はコントロールベクターを導入したNamalwa細胞、グレーの太線はヒトFuc-TIV発現プラスミドを導入したNamalwa細胞、黒の太線はヒトFuc-TIX発現プラスミドを導入したNamalwa細胞の染色結果である。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、特に断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された公知の方法を用いた。

〔実施例1〕新規マウス α 1,3-フコース転移酵素遺伝子(cDNA)のクローン化

(1) マウス脳からのmRNAの取得

BALB/cマウスの脳より、ロッシュ(Roche)社製のmRNA抽出キットである0 ligotexTM-dT30<super>を用いて、約30 μ gのmRNAを取得した。具体的試薬および方法は、キットに添付されている説明書に従った。

(2) マウス脳cDNAのライブラリーの作製

上記(1)で取得したマウス脳由来のmRNA 8 μ g、およびGIBCO BRL社製のキット(SUPERSCRIPT Choice System for cDNA Synthesis)を用い、オリゴdTをプライマーとして2本鎖cDNAを合成した。

これら二本鎖cDNAの両末端に以下の方法でSfi Iリンカーを付与した。

〔Sfi Iリンカーの付与〕

配列番号6で示された一本鎖DNAおよび配列番号7で示された一本鎖DNAをアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

該合成一本鎖DNAをそれぞれ50 μ gずつ、別々に50 mM トリス-HCl (pH 7.5)、10 mM $MgCl_2$ 、5 mM ジチオスレイトール (以下、DTTと略記する)、0.1 mM EDTAおよび1 mM ATPを含む緩衝液 (以下、T4キナーゼ緩衝液と略記する) 50 μ lに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 30単位を加えて、37°Cで16時間リン酸化反応を行ない、11塩基および8塩基のリンカーを取得した。

11塩基のリンカー 4 μ g、8塩基のリンカー 2.9 μ gおよび上記で合成した2本鎖cDNAをT4リガーゼ緩衝液45 μ lに溶解後、T4 DNAリガーゼ1050単位を加え、16°Cで16時間反応させ、該二本鎖DNA各々にSfiIリンカーを付与した。

得られた反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.5 kb以上のDNA断片を回収した。

直接発現クローニングベクター (Expression Cloning Vector) であるpAMo [J.Biol.Chem., 268, 22782(1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] 24 μ gを、10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、6 mM $MgCl_2$ 、50 mM NaCl、6 mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液 (以下、Y-50緩衝液と略記する) 590 μ lに溶解後、80単位のSfiI (宝酒造社製、以下、特に断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものを用了) を加え、37°Cで16時間消化反応を行なった。

該反応液に40単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。

該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約8.8 kbのDNA断片を回収した。

上記で調製したSfiIリンカーを付与したDNA (mRNA 8 μ g由来分) をT4リガーゼ緩衝液250 μ lに溶解後、該溶解液に、該約8.8 kbのDN

A断片 $2\mu\text{g}$ および T4 DNA リガーゼ 2000 単位を加えて、 16°C で 16 時間結合反応を行なった。

反応後、該反応液にトランスファー RNA (tRNA) $5\mu\text{g}$ を添加し、エタノール沈殿後、 10mM トリス-HCl ($\text{pH} 8.0$) および 1mM EDTA (エチレンジアミン 4 酢酸ナトリウム) からなる緩衝液 (以下、TE 緩衝液と略記する) $20\mu\text{l}$ に溶解した。

該反応液を用い、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] により大腸菌 LE 392 株 [モレキュラー・クローニング第 2 版] を形質転換し、約 100 万個のアンピシリン耐性を有する形質転換体を取得し、cDNA ライブラリーを構築した。

(3) 形質転換細胞に抗リス x 糖鎖抗体 (PM-81) との反応性を増加させる遺伝子 (cDNA) のクローン化

上記 (2) で構築した cDNA ライブラリー (大腸菌) から、キアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである /plasmid/maxi kit (商品番号 41031) を用いてプラスミドを調製した。

該プラスミドをエタノール沈殿後、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように TE 緩衝液に溶解した。

該プラスミド ($40\mu\text{g}$) を、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により、Namalwa 細胞に導入した。

1. 6×10^6 細胞あたり $4\mu\text{g}$ のプラスミドを導入した後、 8ml の RPMI 1640 培地 [7.5% NaHCO_3 を $1/40$ 量、 200mM L-グルタミン溶液 (GIBCO 社製) を 3% 、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (GIBCO 社製、 $5000\text{units}/\text{ml}$ ペニシリン、 $5000\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン) を 0.5% 添加した RPMI 1640 培地 (日水製薬社製)] に懸濁し、 CO_2 インキュベーターで 37°C で 24 時間培養した。

培養後、G418 (ギブコ社製) を $0.5\text{mg}/\text{ml}$ になるように添加し、更に

10日間培養し安定形質転換株を取得した。

該形質転換株を、0.5 mg/ml の G 4 1 8 を含む R P M I 1 6 4 0 で培養後、得られた約 4×10^7 個の細胞を、ルイス x 糖鎖に対する抗体である P M - 8 1 を用いた間接蛍光抗体染色に供した。

具体的方法を以下に示す。

約 4×10^7 の安定形質転換細胞を 50 ml の遠心チューブ (2059 チューブ : ファルコン社製) に取り、遠心分離 ($130 \times g$ 、10 分間) により細胞を集めた。

該細胞を、0.1% のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 P B S (A - P B S : 8 g/l N a C l、0.2 g/l K C l、1.15 g/l N a₂H P O₄ (無水)、0.2 g/l K H₂P O₄、0.1% アジ化ナトリウム) 20 ml を用いて洗浄した。

該洗浄細胞に、A - P B S で約 $10 \mu g/ml$ に希釈した抗ルイス x 糖鎖抗体 (P M - 8 1) を 0.5 ml 加えて懸濁し、4℃ で 1 時間反応させた。

反応後、該細胞を A - P B S 20 ml で 1 回洗浄した後、該細胞に、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) で蛍光標識した抗マウス I g M 抗体 (C A P P E L 社製) を A - P B S で 16 倍希釈した溶液を $300 \mu l$ 加えて懸濁し、4℃ で 30 分間反応させた。

反応後、該細胞を A - P B S で 1 回洗浄した後、A - P B S 1 ml に懸濁し、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター [エピックス・エリート・フローサイトメーター (E P I C S E l i t e F l o w C y t o m e t e r) ; コールター (C O U L T E R) 社製] を用いて、蛍光強度の高い細胞 (上位 2.0%) を無菌的に分離回収した。

回収した細胞を、0.5 mg/ml の G 4 1 8 を含む R P M I 1 6 4 0 培地を用い培養し、増殖させた後、上記と同様の操作により蛍光強度の高い細胞を無菌的に分離回収した。

該操作を再度繰り返し、蛍光強度の高い細胞を分離濃縮した。

2回目の操作では蛍光強度の高い細胞（上位1.5%）を、3回目の操作では蛍光強度の高い細胞（上位1.5%）を、4回目の操作では蛍光強度の高い細胞（上位1.0%）を分離回収した。

該分離操作により、蛍光強度の増加した細胞、すなわちルイスx糖鎖の発現量の増加した細胞を取得した。

該細胞を0.5mg/mlのG418を含むRPMI1640培地で培養後、約 2×10^6 個の細胞からハート法 [Mol. Cell. Biol., 8, 2837(1988)] によりプラスミドを回収した。

該プラスミドを、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] により大腸菌LE397株に導入し、アンピシリン耐性を有する形質転換体を取得した。

該形質転換体40個よりプラスミドを調製し、それぞれのプラスミドを、制限酵素 (HindIIIとAsp718) で切断して挿入されたcDNAの構造を調べた。

該プラスミドをフェノールクロロホルム抽出した後、エタノール沈澱を行い、該プラスミドを回収した。

該プラスミドをTE緩衝液10 μ lに溶解し、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)] によりそれぞれのプラスミドをNamalwa細胞に導入した。

即ち、 $1.0 \sim 1.6 \times 10^6$ 個の細胞（200 μ l）に対し、上記で調製したプラスミド3 μ lまたはpAMo（コントロールプラスミド）4 μ gをそれぞれエレクトロポレーション法で導入した後、8mlのRPMI1640培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。

培養後、G418（GIBCO BRL社製）を0.5mg/mlになるように添加して、さらに10～14日培養し、形質転換細胞を取得した。

得られた形質転換細胞について、抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81）を用いた間接蛍光抗体染色を行なったところ、pAMo-mFT9と命名したプラスミドを導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞に比較して、抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81）への反応性（ヒストグラムのピーク値）が約20倍に増加していた。

以上の結果より、プラスミドpAMo-mFT9中に挿入されているcDNAにより、形質転換細胞の抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81）への反応性が増加することが明らかとなった。

抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81）を用いた間接蛍光抗体染色は以下のようにして行なった。

約 1×10^6 個の形質転換細胞をマイクロチューブ（1.5ml：エッペンドルフ社製）にとり、遠心分離（ $550 \times g$ 、7分間）により細胞を集めた。

該細胞を0.9mlのA-PBSで洗浄した後、該洗浄細胞にA-PBSで約 $10 \mu g/ml$ に希釈した抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81）を $20 \mu l$ 加えて懸濁し、 $4^\circ C$ で1時間反応させた。

反応後、細胞を0.9mlのA-PBSで1回洗浄した後、FITCで蛍光標識した抗マウスIgM抗体（CAPPEL社製）をA-PBSで16倍希釈した溶液を $20 \mu l$ 加えて懸濁し、 $4^\circ C$ で30分間反応させた。

反応後、細胞を0.9mlのA-PBSで1回洗浄した後、0.6mlのA-PBSに懸濁し、フルオレッセンス・アクティベータド・セル・ソーターを用いて解析を行なった。また対照実験として、抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81）の代わりにA-PBSを用いて同様の解析を行なった。

（4）プラスミドpAMo-mFT9中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定

上記（3）で得られたプラスミドpAMo-mFT9が含むcDNAの制限酵素地図を作成後、該cDNA由来のDNA断片をpBluescript II SK(-)にサブク

ローニングし、該cDNAの全塩基配列を決定した。塩基配列は、パーキンエルマー社のDNAシーケンサー377を用いて決定した。塩基配列の決定は、パーキンエルマー社のキットを使用し、キットの指示に従って行った。

その結果をつなぎ合わせることにより、プラスミドpAMo-mFT9を含むcDNAの全塩基配列(2170bp)を決定した。

該cDNAの塩基配列を配列番号3に示した。

該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する359アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。該ポリペプチドはこれまでにクローン化された5種のヒト α 1,3-フコース転移酵素とアミノ酸レベルで35%~38%の相同性を示したことから、新規な α 1,3-フコース転移酵素であると考えられた。該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

該ポリペプチドは、N末端の10アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも25アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。他の α 1,3-フコース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の α 1,3-フコース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見(J. Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)、J. Biol. Chem., 270, 8712-8722(1995)、Glycobiology, 7, 921-927(1997))を基に、幹領域は少なくとも25アミノ酸からなると予想された。したがって、56番目から359番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以下、該cDNAをマウスFuc-TIXcDNA、該cDNAがコードするポリペプチドをマウスFuc-TIXと呼ぶ。

〔実施例2〕実施例1で取得したマウスFuc-TIX発現プラスミドを導入したヒト培養細胞における、ルイスx糖鎖およびルイスy糖鎖の合成

コントロールプラスミド(pAMo)およびマウスFuc-TIX発現プラスミド(pAMo-mFT9)をそれぞれ、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液

に溶解した後、エレクトロポレーション法によりNamalwa細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞について、抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81、73-30）、抗ルイスy糖鎖抗体（AH-6）、抗シアリルルイスx糖鎖抗体（KM93）を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

間接蛍光抗体染色は、実施例1の（3）に記載した方法に従って行った。その結果、pAMo-mFT9を導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞に比較して、抗ルイスx糖鎖抗体（PM-81、73-30）への反応性（ヒストグラムのピーク値）がそれぞれ約20倍、抗ルイスy糖鎖抗体（AH-6）への反応性が約7倍増加していた。

一方、抗シアリルルイスx糖鎖抗体（KM93）との反応性はほとんど変化していなかった（第1図参照）。

また比較のために、他の α 1,3-フコース転移酵素（マウスFuc-TIV、ヒトFuc-TVI）を発現させたNamalwa細胞についても同様の解析を行った。即ち、マウスFuc-TIV発現プラスミド（pAMo-mFT4）およびヒトFuc-TVI発現プラスミド（pAMo-hFT6）を導入したNamalwa細胞を取得し、該細胞について上記抗体との反応性を調べた（第1図参照）。

同様にして、コントロールプラスミド（pAMo）、マウスFuc-TIX発現プラスミド（pAMo-mFT9）、ヒトFuc-TIV発現プラスミド（pAMo-mFT4）およびヒトFuc-TVII発現プラスミド（pAMo-mFT7）を導入したNamalwa KJM-1細胞を取得し、該細胞について抗ルイスx糖鎖抗体（KM380）および抗シアリルルイスx糖鎖抗体（CSLEX-1, KM93）を用いて間接蛍光抗体染色を行なった（第2図参照）。

また、コントロールプラスミド（pCDM8）、マウスFuc-TIX発現プラスミド（pCDM8-mFT9）、およびヒトFuc-TIII発現プラスミド（pCDM8-Le）を導入したCOS-1細胞を取得し、該細胞について抗

ルイス a 糖鎖抗体 (7 L E、生化学工業社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった (第 3 図参照)。

各発現プラスミドの作製法および COS-1 細胞への導入法は、実施例 3 に記す。

以上の結果から、Fuc-TIX は形質転換細胞中でルイス x 糖鎖およびルイス y 糖鎖を合成可能であるが、シアリルルイス x 糖鎖およびルイス a 糖鎖は合成しないことが示された。この酵素特性は、これまでにクローン化されている $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素のいずれとも異なり、Fuc-TIX は新規な基質特異性を有する新規な $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素であることが判明した。

Fuc-TIX の基質特異性は、これまでにクローン化された $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素の中では Fuc-TIV に類似しているが、Fuc-TIV がシアリルルイス x 糖鎖も合成するのに対して、Fuc-TIX は合成しないという点で明らかに異なっている。

またこの結果は、Fuc-TIX を細胞で発現させることにより、ルイス x 糖鎖またはルイス y 糖鎖を含有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質を新たに合成できることを意味している。

以上のことより、Fuc-TIX を発現させた細胞を宿主として、有用な糖タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖タンパク質にルイス x 糖鎖またはルイス y 糖鎖を付与することが可能と考えられる。

〔実施例 3〕 マウス Fuc-TIX の in vitro 基質特異性

実施例 1 で取得したマウス Fuc-TIX cDNA がコードする Fuc-TIX の in vitro での基質特異性を以下のようにして調べた。

動物細胞でマウス Fuc-TIX を発現させるため、マウス Fuc-TIX cDNA を動物細胞用発現ベクター pCDM8 に以下のようにしてサブクローン化した。

即ち、pAMo-mFT9 から、マウス Fuc-TIX cDNA のオープン・

リーディング・フレーム (ORF) 部分を含む 1.2 kb の HindIII-AseI 断片を単離し、切断末端を T4 DNA ポリメラーゼにより平滑化後、pBluescript SK(-) の EcoR V サイトにサブクローニングした。

クローニングサイトに隣接した HindIII サイト側に cDNA の 5' 側が、PstI サイト側に cDNA の 3' 側が存在する方向でサブクローニングされているプラスミドを選択し、HindIII と PstI で切断して、マウス Fuc-TI X cDNA を含む 1.2 kb の断片を単離した。

該 1.2 kb の断片を、pCDM8 の HindIII/PstI 間にサブクローン化し、マウス Fuc-TI X 発現プラスミド pCDM8-mFT9 を作製した。

また、他の $\alpha 1, 3$ フコース転移酵素と基質特異性を比較するため、ヒト Fuc-TIII cDNA、マウス Fuc-TIV cDNA、およびヒト Fuc-TV I cDNA を、それぞれ pCDM8 にサブクローン化した発現プラスミド pCDM8-Le (ヒト Fuc-TIII)、pCDM8-mFT4、pCDM8-hFT6 を作製した [Glycoconjugate J., 12, 802-812 (1995)、J. Biol. Chem., 269, 29271-29278 (1994)]。

pCDM8-mFT4 は以下のようにして作製した。

Balb/c マウスの胃から実施例 1 と同様にして mRNA を調製し、cDNA を合成した。

該 cDNA に対して配列番号 8、9 に示したプライマーを用いて PCR を行うことによりマウス Fuc-TIV cDNA の ORF 部分を増幅した。

増幅に用いたプライマーは末端に EcoR I 認識配列を持っているため、増幅断片を EcoR I で切断後、ベクター pBluescript SK(-) の EcoR I サイトにサブクローン化し、pBS-mFT4 を作製した。

別にベクター pCDM8 を HindIII で切断し、切断末端を T4 DNA ポリメラーゼにより平滑化後、EcoR I リンカーを挿入し、HindIII サイトを EcoR I サイトに変換したベクターを作製した。

該ベクターのEcoRIサイトに、pBS-mFT4のマウスFuc-TIV cDNAを含むEcoRI断片をサブクローン化し、pCDM8-mFT4を作製した。

各 $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素発現用プラスミド ($15 \mu\text{g}$) を、COS-1細胞 1×10^7 個にそれぞれ導入した。

導入方法はジーンパルサー (Bio-Rad社製) を用いたエレクトロポレーション法で行い、具体的方法はBio-Rad社添付のマニュアルに従った。この際、遺伝子導入効率の指標となるように、ルシフェラーゼ発現ベクター (ベクター pSVOA/L [実験医学, 7, 96 (1989)] のHindIIIサイトに β -アクチンプロモーターを挿入したもの) $1 \mu\text{g}$ を一緒に遺伝子導入した。

遺伝子導入後、各々のCOS-1細胞を径15cmの細胞培養用ディッシュ3枚に分注して48時間培養した。

上記3枚の内の1枚のディッシュを用い、該ディッシュ中の細胞から、後述する実施例4と同様にして全RNAを抽出し、定量的RT-PCRを行い、各 $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素遺伝子の転写量を測定した。

残り2枚のディッシュを用い、該ディッシュ中の細胞を回収し、溶液 [20 mM HEPES ($\text{pH} 7.4$)、 2% Triton X-100] に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。該細胞溶解液の蛋白質濃度はマイクロBCA蛋白質アッセイ試薬キット (PIERCE社) により測定した。

該細胞溶解液を用いて、ルシフェラーゼおよび $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素の酵素活性を測定した。

ルシフェラーゼ活性は文献 [J. Biol. Chem., 269, 29271-29278 (1994)] 記載の方法で測定し、遺伝子導入効率の検定をした。

その結果、いずれの遺伝子を導入したCOS-1細胞においても、ルシフェラーゼ活性は誤差 $\pm 20\%$ 以内でほぼ一定であり、遺伝子の導入効率にはフコース転移酵素遺伝子間で大きな差はみられなかった。

また、RT-PCRによって測定した各フコース転移酵素遺伝子の発現量と導入効率はほぼ同じであった。

サンプル間の遺伝子導入効率を完全に合わせるため、容積あたりのルシフェラーゼ活性が一定になるように各細胞溶解液を希釈した。

ピリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法〔特開平06-823021、J. Biol. Chem. 269, 14730-14737(1994)〕に準じて行った。

具体的には、活性測定は、10 μ lのアッセイ溶液〔50 mM カコジル酸-HCl (pH 6.8)、5 mM ATP (SIGMA社)、75 μ M GDP-Fuc (SIGMA社)、10 mM L-Fuc (SIGMA社)、25 μ M ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液〕中で37℃、2時間反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生産物を同定することにより行った。

基質として、ラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、LNnTと略記する)、ラクト-N-テトラオース (Lacto-N-tetraose, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、LNTと略記する) (いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製) をアミノピリジンで蛍光標識したもの、およびアミノピリジンで蛍光標識されたLNnTを基質として分泌型の α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) を反応させることにより、アミノピリジンで蛍光標識されたシアリルラクト-N-ネオテトラオース (Sialyllacto-N-neotetraose, NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、 α 2,3-シアリルLNnTと略記する) を用いた。

スタンダードとして、ラクト-N-フコペンタオースII [Lacto-N-fucopentaose II, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、LNFP-IIと略記する]、ラクト-N-フコペンタオースIII [Lacto-N-fucopentaose III, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、LNFP-IIIと略記する]、(いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製) をアミノピリジンで蛍光標識したもの、およびアミノピリジンで蛍光標識された α 2,3-シアリルLNn

Tを基質としてFuc-TVIの分泌型酵素を反応させることにより調製したシアリルラクト-N-フコペンタオースIII [Sialyllacto-N-fucopentaose III, NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; α 2,3-シアリルLNFP-I II) を用いた。

基質の蛍光標識は、常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って行った。

それぞれの基質について、GDP-Fuc (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPLCで解析し、GDP-Fucを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で3分間処理後、10,000×gで5分間遠心して上清を取得し、その一部をHPLCに供した。

HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム (4.6×300mm; 東ソー) を使用し、溶出液として0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) を用い、溶出温度35℃、流速1ml/分の条件で行った。

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920 (日本分光) を用いて行った (励起波長320nm、放射波長400nm)。

生成物の同定は、スタンダードの糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトースをスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

反応生成物の量を、上記で測定した各 α 1,3-フコース転移酵素遺伝子の転写量に基いて校正し、活性とした。

ヒトFuc-TVIの α 2,3-シアリルLNnTを基質とした時の活性を100として、各 α 1,3-フコース転移酵素の各基質に対する相対活性を求めた。

結果を表1に示す。なお、コントロールプラスミド (pCDM8) を導入したCOS-1細胞では、いずれの基質を用いた場合にも活性は検出されなかった。

表1. $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素の各基質に対する相対活性

基質	マウス Fuc-TIX	マウス Fuc-TIV	ヒト Fuc-TIII	ヒト Fuc-TVI
LNT	0	0	123.3	0
LNnT	83.8	51.6	32.3	63.7
$\alpha 2, 3$ -シアリル LNnT	0	4.5	16.4	100

マウスFuc-TIXはLNnTに対してのみ強い活性を示した。

ヒトFuc-TIIIは、LNT、LNnT、および $\alpha 2, 3$ -シアリルLNnTの全てに活性を示した（LNTに最も強い活性）。

マウスFuc-TIVはLNnTに強い活性、 $\alpha 2, 3$ -シアリルLNnTに弱い活性を示した。

ヒトFuc-TVIは、 $\alpha 2, 3$ -シアリルLNnTおよびLNnTに活性を示した（ $\alpha 2, 3$ -シアリルLNnTに最も強い活性）。

Fuc-TIXの*in vitro*基質特異性は、これまでに精製またはクローン化されたいずれの $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素の基質特異性とも異なることから、Fuc-TIXは新規な基質特異性をもつ $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素であることが証明された。

Fuc-TIXの*in vitro*の基質特異性は、実施例2で示された細胞中でのFuc-TIXの基質特異性とよく一致していた。また、Fuc-TIXは他の $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素に比較して、LNnTのGlcNAc残基に $\alpha 1, 3$ 結合でFucを転移する活性が強いことも明らかとなり、ルイスx糖鎖の合成に有用であることが示された。

〔実施例4〕Fuc-TIX遺伝子の各種臓器での発現

(1) ノーザンブロットによる解析

マウス各組織（脳、胸腺、胃、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、子宮、卵巣、肺、精

巢、小腸、副睾丸)より実施例1と同様にしてPoly (A)⁺RNAを単離し、5 μ gを、変性溶液〔50% (v/v) ホルムアミド、2.2 M ホルムアルデヒド、20 mM MOPS〔3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸〕(pH 7.0)、5 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA〕中で65℃で5分間加熱して変性させ、2.2 M ホルムアルデヒドを含む1% アガロースゲルで電気泳動した。

電気泳動後、ゲル中のRNAをニトロセルロースフィルター (Optimal BA-S85; Schleicher & Schuell社)上にブロッティングし、減圧下80℃で1時間加熱し固定化した。

該フィルターをハイブリダイゼーション溶液〔5×SSPE (750 mM NaCl、50 mM NaH₂PO₄、5 mM EDTA; pH 7.4)、5×デンハルト溶液 (0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% ウシ血清アルブミン)、1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、0.2 mg/ml のサケ精子DNA (Pharmacia Biotech社)〕中に浸漬しプレハイブリダイゼーションを行った。

プレハイブリダイゼーション後、該溶液にプローブを添加し、さらに65℃でハイブリダイゼーションを行った。

プローブとしては、pAMo-mFT9中のマウスFuc-TIXのORFを含むHindIII-AseI断片を、マルチプライムDNA標識システム (アマシヤム社)を用いて³²Pで標識したものを用いた。

ハイブリダイゼーション後のフィルターを0.1% SDSを含む0.1×SSC (15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸ナトリウム)で2回洗浄した後、イメージングプレートを感光させ、バイオイメージングアナライザーBAS 2000 (富士写真フイルム)でマウスFuc-TIX mRNAのバンドを検出した。

この結果、脳と腎臓で5.5 kbと3.0 kbの2種類のバンドが見られたが、

他の組織ではバンドは検出されなかった。従って、F u c - T I X 遺伝子は主に腎臓と脳で発現していることが判明した。脳と腎臓でのノーザンブロットの結果を第4図に示した。

(2) R T - P C R を用いた各種臓器における F u c - T I X 転写物の定量

F u c - T I X 遺伝子の発現量を臓器ごとに定量するため、定量的 R T - P C R を行った。

検量線の作成に用いるスタンダード用プラスミドとしては、p A M o - m F T 9 の F u c - T I X c D N A を含む約 1.8 k b の H i n d I I I - K p n I 断片をベクター p B l u e s c r i p t S K (-) の H i n d I I I / K p n I 間にサブクローニングした p B S - m F T 9 を用いた。

p B S - m F T 9 を制限酵素 X c m I と B p u I 1 1 2 0 I で切断し、末端を T 4 D N A ポリメラーゼによって平滑化した後、再度ライゲーションすることにより、F u c - T I X c D N A 中の X c m I - B p u I 1 1 2 0 I 間 1 2 7 b p を欠失させた p B S - m F T 9 d を作成した。

該 p B S - m F T 9 d を R T - P C R の際競合させる内部コントロール用プラスミドとして用いた。

マウス β - アクチン c D N A の取得を、実施例 3 のマウス F u c - T I V c D N A の取得法に準じて、以下のように行った。該マウス β - アクチン c D N A を c D N A 合成の指標となるコントロールとして用いた。

マウス胃 m R N A 由来の 1 本鎖を鋳型として、配列番号 1 0、1 1 に示したプライマーを用いて P C R を行うことにより、マウス β - アクチン c D N A を増幅した。

増幅に用いた配列番号 1 0 のプライマーは末端に E c o R I 認識配列、配列番号 1 1 のプライマーは末端に H i n d I I I 認識配列を持っているので、増幅断片を E c o R I と H i n d I I I で切断後、ベクター p B l u e s c r i p t S K (-) の E c o R I サイトと H i n d I I I サイト間にサブクローン化し、 β - アクチン遺伝子

のスタンダード用プラスミド pBS-m β -actin を作製した。

また、pBS-m β -actin を制限酵素 MscI および BstEII で切断し、末端を T4 DNA ポリメラーゼによって平滑化した後、再度ライゲーションすることにより、 β -アクチン cDNA 中の MscI - BstEII 間 208 bp を欠失させた pBS-m β -actind を作成し、内部コントロール用プラスミドとして用いた。

比較のために、マウス Fuc-TIV 遺伝子の発現分布も検討した。スタンダードプラスミドとしては、実施例3で作製した pBS-mFT4 を使用した。また、pBS-mFT4 を制限酵素 EcoNI および Csp45I で切断し、末端を T4 DNA ポリメラーゼによって平滑化した後、再度ライゲーションすることにより、マウス Fuc-TIV cDNA 中の EcoNI - Csp45I 間 168 bp を欠失させた pBS-mFT4d を作成し、内部コントロール用プラスミドとして用いた。

成体 BALB/c マウスの各組織（脳、胸腺、胃、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、子宮、卵巣、肺、心臓、精巣、小腸、副睾丸）から酸グアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法 [Anal. Biochem. 162, 156-159] により全 RNA を抽出した。

全 RNA 各々 6 μ g に、デオキシリボヌクレアーゼ I（Life Technologies 社製）を 5 単位/ml ずつ添加し、室温で 5 分間反応させた。

反応後、65℃で15分間加熱することにより、酵素を失活させた。

得られた全 RNA 各々について、オリゴ (dT) プライマーを用いて SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies 社) により cDNA を合成した。反応は 20 μ l で行い、反応後の溶液を水で 50 倍希釈し、使用するまで -80℃で保管した。

上述の各組織由来の cDNA 10 μ l および内部コントロール用プラスミド 10 μ l (10 fg) を含む 50 μ l の反応溶液 [10 mM Tris-HCl (

pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μM 遺伝子特異的プライマー]で、DNAポリメラーゼAmpliTaq Gold™ (Parkin Elmer社)を用いてPCRを行った。

Fuc-TIX特異的プライマーの塩基配列を配列番号12、13に、β-アクチン特異的プライマーの塩基配列を配列番号14、15に、Fuc-TIV特異的プライマーの塩基配列を配列番号16、17に示した。

このプライマーにより、マウスFucTIX cDNAについては530 bp、pBS-mFT9dからは403 bpの断片が増幅し、β-アクチンcDNAについては792 bp、pBS-mβ-actindからは584 bpの断片を増幅させることができる。また、マウスFucTIV cDNAについては511 bp、pBS-mFT4dからは343 bpの断片を増幅させることができる。

PCRの条件は、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、Fuc-TIXとFuc-TIVについては38～42サイクル、β-アクチンについては22～26サイクルの反応を行った。

反応後の溶液のうち10 μlを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、写真を撮影した。写真をNIHイメージシステムによりスキニングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。

組織cDNAのかわりにスタンダードプラスミドを1.25 fg、2.5 fg、5 fg、10 fg、20 fg、40 fg用いて、PCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

この検量線と各組織cDNAでの断片の増幅量から、各組織でのcDNAの量を計算し、これを各組織でのmRNA転写量すなわち遺伝子の発現量とした。なお、β-アクチンは各組織で普遍的に発現している遺伝子と考えられるので、どの組織においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各組織におけるβ-アクチン遺伝子の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるの

でF u c - T I X遺伝子の発現量を比較する際に β -アクチンの発現量も考慮した。

結果を第5図に示した。

F u c - T I X遺伝子は、腎臓で最も多く、それに次いで脳で多く発現していることがわかった。また、胃、大腸、子宮、副睾丸でも発現が確認された。

しかし、胸腺、肝臓、脾臓、卵巣、肺、心臓、精巣、小腸では発現はみられなかった。マウスF u c - T I X遺伝子の発現分布は、マウスF u c - T I V遺伝子の発現分布とは明らかに異なっていた（第5図参照）。

〔実施例5〕i n s i t uハイブリダイゼーションによるマウスF u c - T I X遺伝子の脳内発現分布の解析

配列番号18、19に塩基配列を示したプライマーセットを用いて、マウスF u c - T I X c D N Aの一部を増幅し、この増幅断片をT Aクローニング用ベクターp C R 3（Invitrogen社）へサブクローニングした。

同様にして別のプライマーセット（塩基配列を配列番号20および21に示した）を用いて、マウスF u c - T I X c D N Aの一部の断片を増幅し、p C R 3にサブクローニングした。

増幅断片の方向を確認後、これらのプラスミドをH i n d I I Iで切断後、ジゴキシゲニン標識用ミックス（Boehringer Mannheim社）を用いて、S P 6 R N Aポリメラーゼによってインビトロ転写反応を行うことにより、ジゴキシゲニン標識されたアンチセンス・リボプローブあるいはセンス・リボプローブを作製した（アンチセンスかセンスかどうかは増幅断片の方向による）。また、これらのプラスミドをX h o Iで切断後、同様にT 7 R N Aポリメラーゼによってインビトロ転写反応を行うことにより、ジゴキシゲニン標識されたアンチセンス・リボプローブあるいはセンス・リボプローブを作製した（アンチセンスかセンスかどうかは増幅断片の方向による）。

成体B A L B / cマウスの脳組織を4%パラホルムアルデヒド中で一晩処理し

て固定化し、パラフィンに包埋した。

該パラフィンに包埋した脳組織を用い、該脳組織の切片を作製後、切片のパラフィンを除去し水和させた。

該脳組織切片を 0.2 M 塩酸で 20 分間処理することにより、組織中に元からあるアルカリホスファターゼを不活化した後、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ プロテアーゼ K (Boehringer Mannheim社) を添加し 37°C で 15 分間反応させた。

該切片を 4 % パラホルムアルデヒド/PBS (w/v) 中で 10 分間処理して固定化後、非特異的な染色を避けるために、0.2 % グリシン/PBS (w/v) 中に 10 分間浸した。

該切片を脱水後、ハイブリダイゼーション溶液 [50 % ホルムアルデヒド、10 % 硫酸デキストラン、 $1\times$ デンハルト溶液、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.6 M NaCl、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA] 中で、リボプローブと 50°C で 16 時間ハイブリダイズさせた。

該切片を、 $2\times$ SSC で室温で 15 分間、2 回洗浄後、 $0.1\times$ SSC で 50°C で 30 分間洗浄した。

抗ジゴキシゲニン抗体と NBT/BCIP 溶液 (Boehringer Mannheim社) を用いてプローブとハイブリダイズしたシグナルを検出した。

結果の一例を第 6 図に示す。

アンチセンスプローブを用いた際には、海馬のニューロン細胞体で染色がみられ、Fuc-TIX mRNA の発現が検出されたが、グリア細胞では発現が検出されなかった。

一方、ネガティブコントロールとして用いたセンスプローブでは、いずれの細胞についても染色はみられなかった。

以上のことから、マウス Fuc-TIX 遺伝子はニューロン細胞体で発現しており、グリア細胞では発現していないことが判明した。

〔実施例 6〕 ヒト Fuc-TIX 染色体 DNA のクローン化

マウスFuc-TIXc DNAに対応するヒトの遺伝子として、ヒトFuc-TIX染色体DNAのクローン化を行った。

まず、マウスFuc-TIX遺伝子に特異的なプライマー（塩基配列を配列番号22および23に示した）を用いたPCRにより、ヒト染色体DNAライブラリー（PACライブラリー）をスクリーニングすることにより、ヒトFuc-TIX染色体DNAを含有するクローンの取得を行った。

該PACライブラリーの各クローンのうち、405504クローンを、1056枚の384穴プレート（縦16×横24穴）上に1クローン／穴になるようにして培養後、このプレート1056枚を横（X軸：1～12）12枚、縦（Y軸：A～H）8枚、高さ（Z軸：1～11）11枚に積み重ねた。各（Z，Y）座標ごとにX軸方向の12プレート分の全てのクローンを混合し88個のプールを作製した。

別に、各（Z，X）座標ごとにY軸方向の8プレート分の全てのクローンを混合し132個のプールを作製した。

上記88個のプールについて上記プライマーを用いたPCRを行い、どの（Z，Y）座標のプールを鋳型として用いた時にヒトFuc-TIX遺伝子断片が増幅されるか調べた結果、（Z，Y）座標が（8，H）に存在するプールにヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンの存在が認められた。

同様に、上記132プールのうち、特定したZ座標8を含む（8，1～12）の12個のプールについて同様のPCRを行い、（Z，X）座標が（8，12）に存在するプールにヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンの存在が認められた。

以上の結果より、ヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンは（Z，Y，X）座標（8，H，12）に存在することがわかった。

特定した座標（8，H，12）のプレート上に存在する384種の各クローンを、384（縦16×横24）穴プレート用の剣山で同時につついて、2×TY

培地の入った縦溝プレート（384穴プレートの縦16穴が繋がった24本の縦溝をもつプレート）および横溝プレート（384穴プレートの横24穴が繋がった16本の横溝をもつプレート）に植菌し、一晚培養した。

各溝の培養液（40種）のうち1 μ lを鋳型として上記と同様のPCRを行い、ヒトFuc-TIX遺伝子断片の増幅が見られた縦溝と横溝の交点の座標を求めることにより、ヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンの存在する座標を特定した。

特定した座標のクローンからプラスミドDNAを単離し、HindIIIまたはEcoRIで切断後、マウスFuc-TIX cDNA断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。プローブの作製法を以下に示す。

マウスFuc-TIX cDNAを鋳型として、配列番号24および25に示したプライマーを用いてPCRを行うことにより、マウスFuc-TIX cDNA断片を増幅した。

次いで、該断片をマルチプライムDNA標識システム（アマシャム社）を用いて³²Pで標識し、プローブとした。

サザンハイブリダイゼーションの結果、約2.7 kbのHindIII断片と約1.5 kbのEcoRI断片がマウスFuc-TIX cDNAとハイブリダイズした。

ハイブリダイズの結果より、これらの断片がヒトFuc-TIX染色体由来の断片であると考え、該約2.7 kbのHindIII断片をベクターpBluescript SK(-)のHindIIIサイトにサブクローン化し、pBS-hgFT9Hを作製した。

また、該約1.5 kbのEcoRI断片をベクターpBluescript SK(-)のEcoRIサイトにサブクローン化し、pBS-hgFT9Eを作製した。

pBS-hgFT9HおよびpBS-hgFT9Eの塩基配列を実施例1と同様にして決定し、その結果をつなぎ合わせることにより、ヒトFuc-TIX染

色体DNAの塩基配列（2822bp）を決定した。該塩基配列を配列番号4に示した。

ヒトFuc-TIX染色体は、359アミノ酸からなるポリペプチドをコードするORFを有していた。該アミノ酸配列はマウスFuc-TIXのアミノ酸配列（配列番号2に示す）と99.2%（359アミノ酸中356アミノ酸が一致）のホモロジーを示したことから、配列番号4の1289～2368番目の領域は、イントロンを含まないヒトFuc-TIXをコードする塩基配列であると結論した。

ヒトFuc-TIXのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

〔実施例7〕ヒトFuc-TIX cDNAのクローニング

ヒト胃粘膜のPoly(A)⁺RNAよりcDNA合成システム（cDNA Synthesis System、GIBCO BRL社製）を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalI adaptor（SuperScript Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製）を付加した後、クローニングベクターλZAP II（λZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit、STRATAGENE社製）のEcoRI部位に挿入し、Stratagene社 Gigapack III Gold Packaging Extractを用いてin vitro packagingを行うことにより、cDNAライブラリーを作製した。

実施例6で取得したヒトFuc-TIX染色体を含むPACクローンを鋳型として、配列番号26および27に示したプライマーを用いてPCRを行うことにより、ヒトFuc-TIX染色体断片を増幅した。

該断片をマルチプライムDNA標識システム（アマシャム社）を用いて³²Pで標識し、プローブを作製した。

該プローブを用いて、上記で作製したcDNAライブラリー5×10⁵クローンについてブランクハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度のSSPE〔1倍濃度のSSPEの組成は、180mM 塩化ナトリウム、10mM リン酸二水

素ナトリウム、1 mM エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) よりなる (pH 7.4) }、0.1% SDS よりなる緩衝液中で 65℃、10 分間浸漬する条件で 2 回、1 倍濃度の SSPE、0.1% SDS からなる緩衝液中で 65℃、15 分間浸漬する条件で 1 回、0.2x SSPE、0.1% SDS からなる緩衝液中で 65℃、10 分間浸漬する条件で 2 回洗浄した。

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする 4 個の独立したクローンが得られた。Stratagene 社のマニュアルに従って *in vivo* excision を行い、該クローンよりそれぞれプラスミドを回収し、制限酵素解析、塩基配列決定を行った。

塩基配列決定の結果、回収したプラスミドの一つである pBS-hFT9 (S2) には、配列番号 5 に記載した約 2.7 kb の cDNA が含まれることが判明した。

該 cDNA は、ヒト Fuc-TIX 染色体がコードするポリペプチドと同じアミノ酸配列 (配列番号 2 に示す) を有するポリペプチドをコードしていた。

pBS-hFT9 (S2) を含む大腸菌である *Escherichia coli* SOLR™ Strain/pBS-hFT9(S2) は、平成 10 年 7 月 10 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に FERM BP-6416 として寄託されている。

pBS-hFT9 (S2) の構造を第 7 図に示す。

〔実施例 8〕 Fuc-TIX 遺伝子のノックアウトマウスの作製

(1) マウス Fuc-TIX 遺伝子の取得

実施例 4 の (1) で使用したプローブを用いたブランクハイブリダイゼーションにより、λ FIX II / 129 ゲノムライブラリー (Stratagene 社製) をスクリーニングした。約 6×10^4 個をスクリーニングして、4 個の陽性クローンを得た。

二次、三次スクリーニングを行うことにより、それぞれ単一のクローンを取得した。マウス Fuc-TIX 遺伝子特異的な、配列番号 12 で示した塩基配列を有するプライマー (CB-55) および配列番号 13 で示した塩基配列を有するプライマー (CB-56) を使用した PCR および制限酵素切断による解析の結

果、4つのクローンは全て同一であり、Fuc-TIX cDNAの全翻訳領域と3' 非翻訳領域全部を含むことを確認した。このファージクローンをλMFT9-31と呼ぶ。

λMFT9-31 DNAをSalIで消化してFuc-TIX遺伝子を含む染色体DNAを切り出し、pBluescript SK-のSalI部位にサブクローン化することにより、プラスミドpFut9WT-129を造成した。

Fuc-TIX遺伝子を含む染色体DNAの長さは約20 kbであった。該染色体DNAの塩基配列を決定した結果、該染色体DNAは、約4 kbからなるマウスFuc-TIX遺伝子のイントロン2の一部、マウスFuc-TIX遺伝子のエクソン3 (8 bpの5' 非翻訳領域、翻訳領域全部、3' 非翻訳領域全部を含む)、および該エクソン3に続く約14 kbの染色体遺伝子部分を含んでいた。プラスミドpFut9WT-129中の該染色体DNA部分の構造を第8図に示す。一方、5' 非翻訳領域はほとんどこのクローンには含まれてはいなかった。

5' 非翻訳領域部分の遺伝子を取得するために、以下の実験を行った。

5' RACE法を用いてマウスFuc-TIX cDNAの5' 非翻訳領域部分のDNAを取得した。該DNAをプローブとしてλFIXII/129 ゲノムライブラリーをスクリーニングし、独立した2種類の陽性クローン (以下、λMFT9-11およびλMFT9-25と呼ぶ) を取得した。

λMFT9-11およびλMFT9-25のDNAをSalIで消化してFuc-TIX遺伝子を含む染色体DNAを切り出し、pBluescript SK-のSalI部位にそれぞれサブクローンした。λMFT9-11およびλMFT9-25のFuc-TIX遺伝子を含む染色体DNAの長さは、それぞれ約12 kbと約16 kbであった。塩基配列を決定した結果、λMFT9-11およびλMFT9-25は、それぞれエクソン1およびエクソン2を含むことが判明した。

以上の結果、マウスFuc-TIX遺伝子は3つのエクソンから構成されることが判明した。エクソン/イントロン結合部位の配列は、GT-AGルールに一致していた。エクソン1の上流はマウスFuc-TIX遺伝子のプロモーター領域を含むと考えられる。エクソン1~3の配列およびプロモーター領域を含むと考えられるエクソン1の上流部分の塩基配列を、それぞれ配列番号28~31に示す

。マウスFuc-TIX遺伝子の構造を第9図に示す。

また、常法 [Mamm. Genome, 5, 253 (1994)] に従ってinterspecific backcross DNA panelを鋳型としてPCRを行うことにより、マウスFuc-TIX遺伝子(第10図中Fut9として示す)の染色体上の位置を調べた。

プライマーとして、配列番号13に示される塩基配列を有するDNA (CB-56) および配列番号32に示される塩基配列を有するDNA (CB-197) をそれぞれ用いた(第8図参照)。CB-197はイントロン2中に設定したプライマーである。

PCR反応は、interspecific backcross DNA panelの染色体DNA (10 ng) を含む50 μ lの反応溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μ M 遺伝子特異的プライマー、DNAポリメラーゼAmpliTaq Gold™ (Parkin Elmer社) 1 μ l]を用いて、94℃で1分間、64℃で1分間、72℃で3分間からなる反応を1サイクルとして、35サイクル行った。

PCRの結果、マウスFuc-TIX遺伝子は第4番染色体に位置し(第10図)、マーカー遺伝子(Aop2-rs2, D4Ertd519e, D4Ertd582e)の近傍に存在していることが明白となった。また、マウスFuc-TIX遺伝子はマーカー遺伝子D4Ertd389eからは1.1 \pm 1.1 cM遠位に、マーカー遺伝子D4Abbleからは4.25 \pm 2.1 cM近位に位置していた。

(2) 相同組換え用ターゲティングベクターの作製

マウスFuc-TIX遺伝子の翻訳領域の3'末端側半分と3'非翻訳領域全部を除去し、代わりにネオマイシン耐性遺伝子を組み込むことにより、マウスFuc-TIX遺伝子ノックアウトマウスを作製するためのターゲティングベクターであるpFut9F [tkneo]を、以下の方法で作製した(第8および11図)。

プラスミドpFut9WT-129に含有されるFuc-TIX遺伝子を含む染色体DNAを3断片(B1、B2、B3)に分けてサブクローン化を行った。

プラスミドpFut9WT-129をBamHIで切断し、約1.8 kbのBamHI断片を取得した。該断片をpBluescript SK-のBamHI部位に組み込む

ことにより、プラスミド p B 1 を作製した。

プラスミド p F u t 9 W T - 1 2 9 を B a m H I で切断し、約 6. 0 k b の B a m H I 断片を取得した。該断片を pBluescript SK- の B a m H I 部位に組み込むことにより、プラスミド p B 2 を作製した。

プラスミド p F u t 9 w t - 1 2 9 を B a m H I で切断し、1 5 k b の B a m H I 断片を取得した。該断片を連結して環状にすることにより、プラスミド p B 3 を作製した。

上記で得られた、p B 2 を利用して、マウス F u c - T I X 遺伝子の翻訳領域の 3' 末端側半分と 3' 非翻訳領域全部を除去し、代わりにネオマイシン耐性遺伝子を組み込むこんだプラスミド p B 2 - N e o を造成した。

プラスミド p B 2 を X h o I で切断し 9. 0 k b の X h o I 断片を取得した。該 DNA 断片を DNA ポリメラーゼ・クレノー断片で処理することにより、X h o I 切断末端を平滑末端に変換した後、該断片を連結して環状にすることにより、p B 2 の X h o I 切断部位を消失させたプラスミドを造成した。

該プラスミドを S a c I で部分切断し、約 6. 1 k b の S a c I 断片を取得した。該 DNA 断片を DNA ポリメラーゼ・クレノー断片で処理することにより、S a c I 切断末端を平滑末端に変換した後、X h o I リンカーを付加し、該 DNA 断片を連結して環状にすることにより、p B 2 - X h o I を造成した。

p B 2 - X h o I を X h o I で切断し、6. 1 k b の X h o I 断片を取得した。また、p M C 1 N e o p o l y A (Stratagene 社製) を X h o I と S a l I で切断することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む 1. 2 k b の X h o I - S a l I 断片を取得した。p B 2 - X h o I 由来の 6. 1 k b の X h o I 断片と、p M C 1 N e o p o l y A 由来の 1. 2 k b の X h o I - S a l I 断片を連結することにより、プラスミド p B 2 - N e o を造成した。

更に、p B 3 を利用して、B 3 断片の 3' 末端にネガティブセレクション用のマーカーであるチミジンキナーゼ遺伝子を連結したプラスミド p B 3 - t k を、以下のように造成した。

p B 3 を X h o I で切断し、1 5 k b の X h o I 断片を取得した。また、プラスミド M C - 1 - T K (Nature, 336, 348 (1988)) を X h o I と S a l I で切断

することにより、チミジンキナーゼ遺伝子を含む1.8 kbのXhoI-SalI断片を取得した。pB3由来の15 kbのXhoI断片と、MC-1-TK由来の1.8 kbのXhoI-SalI断片を連結することにより、プラスミドpB3-tkを造成した。

上記で作製したpB2-NeoをBamHIで切断し、4.0 kbのBamHI断片を取得した。また、上記で作製したpB3-tkをBamHIで切断し、17 kbのBamHI断片を取得した。pB2-Neo由来の4.0 kbのBamHI断片と、pB3-tk由来の17 kbのBamHI断片を連結することにより、プラスミドpFut9F [tkneo]を造成した。

(3) 相同組換えした杯性幹細胞 (ES細胞) 株の作製

上記(2)で作製したプラスミドpFut9F [tkneo]をNotIで切断したDNA断片(25 μ g)を、PBSで 2.5×10^7 細胞/mlに調製したES細胞0.8 mlと混合した。

Gene Pulser (BioRad社製)を用いて0.35 kV、950 μ Fの条件でエレクトロポレーションを行うことにより、NotI切断DNA断片をES細胞に導入した。

該ES細胞を、予めフィーダー細胞をまいた10 cm culture dishに 1×10^7 細胞ずつまき、15% FBS-DMEM培地(10³ units/mlのESGRO (GIBCO社製)、100 mMの β -メルカプトエタノール、100 units/mlのpenicillin (GIBCO社製)、および100 μ g/mlのstreptomycin (GIBCO社製)を含む)で培養した。2日目より200 μ g/mlのG418 (GIBCO社製)と2 μ MのGancyclovir (Syntex社製)を添加し、遺伝子導入細胞の選択を行った。

選択を開始してから8~10日後に出現したコロニーの単離を行い、計144種のES細胞株を単離した。そのうち39種のES細胞から常法にしたがって染色体DNAを単離し、PCRを用いてターゲティングベクターが相同組換えにより組み込まれた細胞の選別を行った。

染色体DNAの単離は以下のように行った。

24穴プレートで培養した細胞に500 μ lのlysis buffer(10 mM Tris

s-HCl (pH 7.8)、1 mM EDTA、0.1 M NaCl、0.1 % SDS]を加えて細胞を溶解し、フェノール抽出、エタノール沈殿によって染色体DNAを単離した。

PCRには、ターゲティングベクター中に組み込まれたマウスFuc-TIX遺伝子のさらに上流部分に設定した配列番号32に示される塩基配列を有するDNA (CB-197) およびネオマイシン耐性遺伝子中に設定した配列番号33に示される塩基配列を有するDNA (CB-199) (第8図参照)をプライマーとして用いた。

PCRは以下の条件で行った。

ES細胞から単離した染色体DNAを含む50 μ lの反応溶液 [1 \times LA PCRTM buffer II (Mg²⁺ free)、2.5 mM MgCl₂、dNTP各0.4 mM、上記プライマー各0.2 μ M、2 unit Takara LA TaqTM]を用いて、94℃で1分間加熱した後、98℃で20秒間、68℃で8分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った。

マウスFuc-TIX遺伝子とターゲティングベクターが相同組換えを起こし、マウスFuc-TIX遺伝子のエクソン3の後半部分が破壊されたES細胞では、約3 kbのDNA断片が増幅されることになる。39種のES細胞株について解析した結果、3種のES細胞株について約3 kbのDNA断片の増幅が確認された。これらの3種のES細胞株については、目的通りマウスFuc-TIX遺伝子が破壊されていると結論された。

(4) マウスFuc-TIX遺伝子ノックアウトマウスの作製

交配後3.5日目のC57BL/6マウス(4週齢の雌)から子宮を摘出し、胚盤胞を採取した。上記(3)で取得したマウスFuc-TIX遺伝子が破壊されたES細胞(3種類)を、それぞれマイクロマニピレーターを用いて胚盤胞に導入(胚盤胞1個当たりES細胞15個程度)し、偽妊娠した仮親マウス(ICR)の子宮の両側に各10個ずつ胚盤胞を移植した。

その結果、95匹の産子が得られ、そのうち44匹(雄31匹、雌13匹)が毛色からキメラマウスと判断された。これらキメラマウスと正常C57BL/6マウスを交配してヘテロマウスを取得した後、さらにヘテロマウス同士を交配することによ

ってノックアウトマウスを取得した。

ヘテロマウス同士を交配することによって得られた産仔について、尾から染色体DNAを抽出し、PCR法により遺伝子型の検定を行った。

プライマーCB-197、CB-199および配列番号34に示す塩基配列を有するDNA (CB-280) (第8図参照) を同時に使用してLong PCRを行うと、野生型マウスではCB-197とCB-280によって増幅される約3.5 kbのバンドのみが検出され、欠損型のFuc-TIX遺伝子をホモで有するマウスでは、CB-197とCB-199によって増幅される約3.0 kbのバンドのみが検出され、ヘテロマウスではCB-197とCB-280によって増幅される約3.5 kbのバンドと、CB-197とCB-199によって増幅される約3.0 kbのバンドの両方が検出される。

第12図に、PCRによる解析結果の一例を示す。No. 5のマウスは、欠損型のFuc-TIX遺伝子をホモで有するマウス (Fuc-TIX遺伝子ノックアウトマウス) であることがわかる。

ヘテロマウス同士を交配することによって34匹の産仔を取得し、このうち、野生型マウスは11匹、ヘテロマウスは17匹、Fuc-TIX遺伝子ノックアウトマウスは6匹 (雄4匹、雌2匹) であった。

Fuc-TIX遺伝子ノックアウトマウスは、Fuc-TIX遺伝子の生理学的機能および病理学的機能の解析に極めて有用である。

〔実施例9〕 Fuc-TIXの反応特異性の解析

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、N-アセチルラクトサミンが $\beta 1, 3$ 結合で繰り返し結合した構造〔(Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$) n ; n は2以上〕を有する糖鎖で、糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖やO-グリコシド結合型糖鎖中に存在するほか、糖脂質の糖鎖中やオリゴ糖中にも存在する。

ヒトFuc-TIXおよびこれまでにクローン化された5種のヒト $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素 (Fuc-TIII、Fuc-TIV、Fuc-TV、Fuc-TVI、Fuc-TVII) について、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を基質として用いたとき、該糖鎖中のどのGlcNAcにフコースを転移することができるか検討した。

実施例7で取得したpBS-hFT9 (S2) を PstI と HindIII で切断した後、DNAポリメラーゼ・クレノー断片により切断末端を平滑末端に変換した。変換後、実施例1の(2)で調製した SfiI リンカーを付加し、約1.6 kbの断片を取得した。

発現ベクターpAMoを SfiI で切断し、約8.7 kbの SfiI 断片を取得した。

pBS-hFT9 (S2) 由来の約1.6 kbの断片と、pAMo由来の約8.7 kbの SfiI 断片を連結することにより、ヒトFuc-TIXの発現プラスミドであるpAMo-FT9を造成した。

実施例1の(3)に示した方法に従って、コントロールプラスミド(pAMo)とヒトFuc-TIX発現プラスミドpAMo-FT9をNamalwa細胞に導入し、安定形質転換細胞を取得した。

既報 [Glycoconjugate J., 13, 802-812, Biochem. Biophys. Res. Commun., 237, 131-137 (1997)] に従って、他の5種のヒト α 1,3-フコース転移酵素 (Fuc-TII, Fuc-TIV, Fuc-TV, Fuc-TVI, Fuc-TVII) を発現するNamalwa細胞を取得した。

上記形質転換細胞 (約 1×10^7 個) をマイクロチューブ (1.5 ml : エッペンドルフ社製) に各々採取し、遠心分離 ($550 \times g$, 7分間) により細胞を集めた。

該細胞を0.9 mlのPBSで洗浄した後、該洗浄細胞を20 mM HEPES (pH 7.2)、1% TrironX-100からなる溶液 (100μ l) に懸濁し4℃で10分間放置した後、超音波破碎機 (Bioruptor; コスモ・バイオ社製) を用いて細胞を破碎した。

破碎後、遠心分離 ($550 \times g$, 7分間) により各々上清を取得し、該上清を酵素サンプルとした。

基質として、6糖からなるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) を2-アミノベンズアミド (2-aminobenzamide) を用いて蛍光標識した糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB : 第13図、第15図および表3中ではSと略した)

を使用した。

蛍光標識はSignal™ 2-AB glycan labelling kit (Oxford GlycoScience社製)を用いて行った。ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) の調製は [WO 98/03524] に従って行った。

活性測定は以下のようにして行った。

20 μ l のアッセイ溶液 [50 mM cacodylate (pH 6.8)、5 mM ATP、10 mM L-fucose、75 μ M UDP-Fuc (SIGMA社製)、25 mM MnCl₂、15 μ M ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液 6 μ l] 中で 37℃、2 時間反応後、100℃で 3 分間処理することにより反応を停止した。停止後、200 μ l の水を添加後、10,000 \times g で 5 分間遠心分離して上清を取得し、その一部 (10 μ l) を用い、下記 HPLC 条件で生成物を解析した。

HPLC :

カラム - TSK-gel ODS-80TsQA カラム (4.6 \times 250 mm ; 東ソー)

溶出液 - 7% のメタノールを含む 0.02 M 酢酸アンモニウム緩衝液
(pH 4.0)

溶出温度 - 50℃

流速 - 1.0 ml / 分の条件で行った。

検出 - 蛍光スペクトルフォトメーター FP-920 (日本分光社製) (励起波長 330 nm、放射波長 420 nm)

HPLC 解析の結果の 1 例を第 13 図に示す。第 13 図の (a) はコントロールプラスミドを導入した細胞由来の抽出液を酵素サンプルとして使用したものである。第 13 図の (b) は、Fuc-TIV を発現させた細胞由来の抽出液を酵素サンプルとして使用したものである。第 13 図の (c) は、Fuc-TIX を発現させた細胞由来の抽出液を酵素サンプルとして使用したものである。

Fuc-TIV または Fuc-TIX を発現させた細胞由来の抽出液を酵素サ

ンプルとして使用した場合には、3種の生産物（P 1、P 2、P 3）が生産されることが明らかとなった。

基質の還元末端のGlcNAcは、2-アミノベンズアミド（2-aminobenzamide）による蛍光標識により開環しているため、生産物としては以下の3種が考えられた。
Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB。

生産物の構造を、以下の方法で確認した。

各生産物（P 1、P 2またはP 3）を分取後、スピードバック（SAVANT社製）を用いて完全に乾燥した。次いで、乾燥物を水にとかし、不溶画分を遠心で除去した後、以後の解析に使用した。

該各生産物（P 1、P 2またはP 3）を、下記HPLC条件で解析することにより、生産物の分子量の大きさを比較した。

HPLC：

カラム —GlycoSep™ N HPLCカラム

（4. 6 × 250 mm ; Oxford GlycoScience社製）

溶出液 —65%のアセトニトリルを含む0.25 M 蟻酸アンモニウム緩衝液（pH 4. 4）

溶出温度—30℃

流速 —1. 0 ml / 分

検出 —蛍光スペクトルフォトメーターFP-920（日本分光）

（励起波長330 nm、放射波長420 nm）

分子量マーカー—2-アミノベンズアミド（2-aminobenzamide）で蛍光標識したグルコースホモポリマー（Oxford GlycoScience社製）

結果を第14図の（a）～（c）に示す。

P 1とP 2は同じ位置に溶出され〔第14図の（a）と（b）参照〕、P 3の溶出時間よりP 3はP 1およびP 2に比較して約グルコース1個分大きいことが判明した〔第14図の（c）参照〕。

以上のことより、P 1 および P 2 は、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB または Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB のどちらかに対応し、P 3 は Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB と考えられた。

分取した各生産物 (P 1、P 2 または P 3) を 300 mU/ml の Jack bean β -galactosidase (Oxford GlycoScience 社製) を含む 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) 中で 37°C で 15 時間処理後、上記と同様にして反応液を GlycoSep™ N HPLC カラム (4.6 \times 250 mm; Oxford GlycoScience 社製) を用いた HPLC で解析した。

結果を第 14 図の (d) ~ (f) に示す。

生産物 P 1 と生産物 P 3 の溶出位置は Jack bean β -galactosidase 処理の前後で変化がなかった [第 14 図の (a) と (d) または (c) と (f) 参照] が、生産物 P 2 は、Jack bean β -galactosidase 処理後に、グルコース約 1 個分の分子量が減少した [第 14 図の (b) と (e) 参照]。この結果は、生産物 P 2 の構造は Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB であることを示している。したがって、生産物 P 1 の構造は Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB であると考えられた。

各種グリコシダーゼを用いて、さらに詳細に生産物の構造を確認した。

分取した各生産物 (P 1、P 2 または P 3) を 0.2 mU/ml の almond meal α 1,3/4-fucosidase (Oxford GlycoScience 社製) を含む 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で 37°C で 15 時間処理後、上記と同様にして、反応液を TSK-gel ODS-80Ts QA カラム (4.6 \times 250 mm; 東ソー) を用いる HPLC により解析した (第 15 図)。

その結果、生産物 P 1 の溶出位置は almond meal α 1,3/4-fucosidase 処理の前後で変化し [第 15 図の (a) と (b) 参照]、酵素処理後の溶出位置は基質の溶出位置と一致した [第 15 図の (b) と (c) 参照]。

生産物 P 2 の溶出位置は almond meal α 1,3/4-fucosidase 処理の前後で変化しなかった [第 15 図の (d) と (e) 参照]。

生産物 P 3 の溶出位置は almond meal α 1,3/4-fucosidase 処理の前後で変化し

〔第15図の(j)と(k)参照〕、酵素処理後の溶出位置は生産物P2の溶出位置と一致した〔第15図の(k)と(d)参照〕。

上記結果は、生産物P1、P2、P3の構造はそれぞれGal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2ABであることを示している。

生産物P2の構造をさらに確認するために、生産物P2をJack bean β -galactosidase、Jack bean β -N-acetylhexosaminidaseおよびalmond meal α 1,3/4-fucosidaseで順次処理し、反応液を、TSK-gel ODS-80TsQAカラム(4.6 \times 250mm;東ソー)を用い、上記と同じ条件でHPLCにより解析した。

生産物P2を600mU/mlのJack bean β -galactosidase (Oxford GlycoScience社製)を含む50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)中で37℃で15時間処理後、100℃で5分間処理することにより反応を停止した。

得られた反応液の一部にJack bean β -N-acetylhexosaminidase (Oxford GlycoScience社製)を10U/ml添加し、37℃で15時間処理後、100℃で5分間処理することにより反応を停止した。

得られた反応液に更に0.2mU/mlのalmond meal α 1,3/4-fucosidase (Oxford GlycoScience社製)を添加し、37℃で15時間処理後、100℃で5分間処理することにより反応を停止した。

第15図の(f)に生産物P2をJack bean β -galactosidaseのみで処理した時のHPLCパターンを、第15図の(g)に生産物P2をJack bean β -galactosidase処理後、Jack bean β -N-acetylhexosaminidaseで処理した時のHPLCパターンを、第15図の(h)に生産物P2をJack bean β -galactosidase処理後、Jack bean β -N-acetylhexosaminidaseおよびalmond meal α 1,3/4-fucosidaseで順次処理した時のHPLCパターンを示した。

生産物P2をJack bean β -galactosidase処理後、Jack bean β -N-acetylhexosaminidaseおよびalmond meal α 1,3/4-fucosidaseで順次処理した時の溶出位置〔第15図の(h)参照〕は、4糖からなるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖(

Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) を 2-アミノベンズアミド (2-aminobenzamide) を用いて蛍光標識した糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB) の溶出位置 [第 15 図の (i) 参照] と一致していた。

以上の結果より、生産物 P 2 の構造は Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB であることを確認した。

4 糖からなるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖は WO 98/03524 記載の方法に準じて調製し、Signal™ 2-AB glycan labelling kit (Oxford GlycoScience 社製) を用いて蛍光標識した。

生産物 P 3 を almond meal α 1,3/4-fucosidase 処理後、生産物 P 2 に関して行った条件と同じ条件で、Jack bean β -galactosidase、Jack bean β -N-acetylhexosaminidase および almond meal α 1,3/4-fucosidase で順次処理することにより、P 3 の構造が Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-2AB であることを確認した。

ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖 (S) を基質として酵素反応を行うと、Fuc-TIV を発現する Namalwa 細胞の抽出液を酵素として用いた場合には、生産物 P 2 (VIM2 糖鎖) が主に生産され [第 13 図の (b)、表 2 参照]、Fuc-TIX を発現する Namalwa 細胞の抽出液を酵素として用いた場合には、生産物 P 1 (Le^x 糖鎖) が主に生産された [第 13 図の (c)、表 2 参照]。

同様にして解析した結果、Fuc-TIII、Fuc-TV、または Fuc-TVI を発現する Namalwa 細胞の抽出液を酵素として用いた場合には、生産物 P 2 (VIM2 糖鎖) が主に生産された (表 2)。Fuc-TVII を発現する Namalwa 細胞の抽出液を酵素として用いた場合には、生産物は生産されなかった (表 2)。

表 2. ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖に対する酵素活性

酵素	生産量 (%)		
	P1	P2	P3
Fuc-TIII	2.0	98.0	0.0
Fuc-TIV	22.2	72.0	5.8
Fuc-TV	7.5	92.5	0.0
Fuc-TVI	8.3	88.7	3.0
Fuc-TVII	0.0	0.0	0.0
Fuc-TIX	82.7	13.4	3.9

各酵素によって生産される生産物(P1、P2およびP3)の総量を100%として、各生産物の生産量を相対値(%)で表した。

以上の結果から、Fuc-TIII、Fuc-TIV、Fuc-TV、およびFuc-TVIは、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の内側のGlcNAc残基にフコースを転移し、VIM2糖鎖を合成する活性が強いことが明らかとなった。一方、Fuc-TIXは非還元末端側のGlcNAc残基にフコースを転移し、Le^x糖鎖を合成する活性が強いことが明らかとなった。Fuc-TIXは、他の α 1, 3-フコース転移酵素と比較して明らかに異なる活性を有する α 1, 3-フコース転移酵素であることが示された。また、Fuc-TIXを用いて、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の末端に効率よくLe^x糖鎖を合成できることが示された。

上記基質(S)に加え、生産物P1または生産物P2を基質として用い、Fuc-TIV、Fuc-TVIおよびFuc-TIXの酵素活性を測定した。

結果を表3に示す。

Fuc-TIVおよびFuc-TVIは、生産物P1をよい基質として生産物P3を合成した。一方、Fuc-TIXは、生産物P2をよい基質として生産物P3を合成した。

以上の結果より、生産物P3(dimeric Le^x糖鎖)は、Fuc-TIXと他の α 1, 3-フコース転移酵素(例えばFuc-TIVまたはFuc-TVI)が共に働くことにより、効率的に合成されることが考えられた。

表3. ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖および
モノフコシルポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖に対する酵素活性

基質	生産物	Fuc-TIV	Fuc-TVI	Fuc-TIX
S	P1	1.6	2.3	7.2
S	P2	4.1	16.4	1.6
S	P3	0.5	0.8	0.7
P1	P3	2.8	7.6	1.0
P2	P3	1.0	1.0	5.0

P2を基質とした時の酵素活性を1としてFuc-TIVおよびFuc-TVIの活性を、P1を基質とした時の酵素活性を1としてFuc-TIXの活性を、それぞれ相対活性として示した。

〔実施例10〕ヒトFuc-TIXの発現プラスミドを導入したヒト培養細胞におけるVIM2糖鎖の合成

実施例9で造成した、ヒトFuc-TIVまたはヒトFuc-TIXを発現させたNamalwa細胞、およびコントロールベクターpAMoを導入したNamalwa細胞について、抗VIM2糖鎖抗体（抗CDw65抗体：Serotec社製）ならびに抗Le^x糖鎖抗体[73-30（生化学工業社製）および抗CD15抗体（C3D-1：Dako社製）]を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。VIM2糖鎖は、糖鎖の非還元末端にGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAcという構造を有する糖鎖である。

間接蛍光抗体染色は、実施例1の（3）に記載した方法に従って行った。抗VIM2糖鎖抗体、73-30、C3D-1は、それぞれ1/50、1/100、1/50希釈して使用した。

結果を第16図に示す。

Fuc-TIVを発現させたNamalwa細胞においては、pAMoを導入したNamalwa細胞に比較して、抗VIM2糖鎖抗体への反応性が顕著に増加していたが、Fuc-TIXを発現させたNamalwa細胞においては、抗VIM2糖鎖抗体への反応性の増加はわずかであった。一方、抗Le^x糖鎖抗体[73-30および抗CD15抗体]への反応性は、Fuc-TIXを発現させたNamalwa細胞の方が、Fuc-TIVを発現させたNamalwa細胞に比較して強かった。

以上の結果から、F u c - T I Vは、形質転換細胞中でV I M 2糖鎖を合成する活性が強いことが示された。一方、F u c - T I Xは形質転換細胞中でL e^x糖鎖を合成する活性は強いが、V I M 2糖鎖を合成する活性は弱いことが示された。これらの結果は、実施例9のin vitro活性のデータとよく一致している。

F u c - T I VとF u c - T I Xの反応特異性は、細胞中でも明らかに異なることが示された。

産業上の利用可能性

本発明は、ルイスx糖鎖およびルイスy糖鎖を合成する活性を有し、かつシアリルルイスx糖鎖を合成する活性を有しない新規な基質特異性を有する α 1,3-フコース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAの製造法、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたF u c含有糖鎖の製造法、該組換え体ベクターを含有する形質転換体を用いたF u c含有糖鎖の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法、該DNAあるいは該抗体を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断法、該DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾病の治療法を提供することができる。

「配列表フリーテキスト」

配列番号6－人工配列の説明：合成DNA

配列番号7－人工配列の説明：合成DNA

配列番号8－人工配列の説明：合成DNA

配列番号9－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 1 0－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 1－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 2－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 3－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 4－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 5－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 6－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 7－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 8－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 9－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 0－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 1－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 2－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 3－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 4－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 5－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 6－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 7－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 2－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 3－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 4－人工配列の説明：合成DNA

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する α 2,3-シアルルN-アセチルラクトサミン (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチド。
2. 以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるポリペプチド。
 - (a) 配列番号 1 または 2 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (b) 配列番号 1 または 2 記載のアミノ酸配列の 56 番目から 359 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド
 - (c) (a) または (b) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する α 2,3-シアルルN-アセチルラクトサミン (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチド
3. 糖鎖の非還元末端に存在するGal β 1-4GlcNAc構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性がルイス x 糖鎖 [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] およびルイス y 糖鎖 [Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] を合成する活性であり、糖鎖の非還元末端に存在するNeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc構造中のN-アセチルグルコサミン残基に α 1,3結合でフコースを転移する活性がシアルルルイス x 糖鎖 [NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] を合成する活性である、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。
4. 以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) およ

び (h) から選ばれる DNA。

(a) 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列の 280 から 1194 番目の塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 3 で表される塩基配列の 115 から 1194 番目の塩基配列を有する DNA

(d) 配列番号 4 で表される塩基配列の 1454 から 2368 番目の塩基配列を有する DNA

(e) 配列番号 4 で表される塩基配列の 1289 から 2368 番目の塩基配列を有する DNA

(f) 配列番号 5 で表される塩基配列の 460 から 1374 番目の塩基配列を有する DNA

(g) 配列番号 5 で表される塩基配列の 295 から 1374 番目の塩基配列を有する DNA

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) の DNA から選ばれる DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする DNA であり、糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に α 1,3 結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する α 2,3-シアリル N-アセチルラクトサミン (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に α 1,3 結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチドをコードする DNA

5. 請求項 4 記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA

6. 組換え体 DNA が、プラスミド pAM_o-mFT9 またはプラスミド p

B S - h F T 9 (S 2) である、請求項 5 記載の組換え体 DNA。

7. 請求項 5 または 6 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。

8. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物から選ばれる形質転換体である、請求項 7 記載の形質転換体。

9. 微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 8 記載の形質転換体。

10. 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO 細胞、BHK 細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、N amalwa 細胞、Namalwa KJM-1 細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、請求項 8 記載の形質転換体。

11. 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞、Trichoplusia ni の卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、請求項 8 記載の形質転換体。

12. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

13. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

14. 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 13 記載の製造法。

15. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

16. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA を用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

17. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc)、ii) N-アセチルラクトサミン構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii) N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、iv) それらの N-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体、および v) それらの N-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該 N-アセチルラクトサミン構造中のガラクトース残基に α 2,3 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) グアノシン 5' - ニリン酸フコースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の N-アセチルラクトサミン構造中の N-アセチルグルコサミン残基に α 1,3 結合でフコースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

18. 誘導体が、Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc、Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc、GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc、Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4GlcNAc(6SO₃⁻)、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖

質から選ばれる誘導体である、請求項 17 記載の製造法。

19. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) ラクトース ($\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$)、ii) ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii) ラクトース構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、iv) それらのラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体、およびv) それらのラクトース構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該ラクトース構造中のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) グアノシン 5' - ニリン酸フコースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のラクトース構造中のグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でフコースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

20. 誘導体が、 $\text{Gal } \alpha 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-3(\text{Fuc } \alpha 1-2)\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{GalNAc } \alpha 1-3(\text{Fuc } \alpha 1-2)\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal } \alpha 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}(6\text{SO}_3^-)$ 、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、請求項 19 記載の製造法。

21. 請求項 8 記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にフコースが $\alpha 1,3$ 結合で N - アセチルグルコサミン残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

22. 請求項 8 記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、

フコースが $\alpha 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミン残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

23. 請求項 8 記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、フコースが $\alpha 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミン残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

24. 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項 17～23 のいずれか一つに記載の製造法。

25. 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 22 記載の製造法。

26. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

27. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号 3 で表される塩基配列を有するDNA、配列番号 4 で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号 5 で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAの有する塩基配列中の連続した 10～50 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

28. 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエス

テル結合がホスフロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、請求項 27 記載のオリゴヌクレオチド。

29. 請求項 27 または 28 記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

30. 請求項 26 または 29 記載の方法を用いた、脳疾患、腎疾患または癌の検出法。

31. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA、配列番号 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 4 で表される塩基配列を有する DNA および配列番号 5 で表される塩基配列を有する DNA から選ばれる DNA を用い、請求項 1、2 または 3 記載のポリペプチドをコードする DNA の転写を抑制する方法。

32. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA、配列番号 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号

4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAを用い、請求項1、2または3記載のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

33. 請求項27または28記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項1、2または3記載のポリペプチドをコードするDNAの転写を抑制する方法。

34. 請求項27または28記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項1、2または3記載のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

35. 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを認識する抗体。

36. 請求項35記載の抗体を用いる、請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドの免疫学的検出法。

37. 請求項35記載の抗体を用い、請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

38. 請求項35記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

39. 請求項35記載の抗体を含有する、脳疾患、腎疾患または癌の診断薬。

40. 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法。

41. 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗ルイスx抗体または抗ルイスy抗体を用い、ルイスx糖鎖含量またはルイスy糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

42. 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項35記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子

の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

43. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーター DNA。

44. プロモーター DNA が、神経細胞、腎細胞、胃上皮細胞、白血球細胞、脳腫瘍細胞、神経芽細胞腫細胞、メラノーマ細胞、腎癌細胞、胃癌細胞、大腸癌細胞、および膀胱癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、請求項 43 記載のプロモーター DNA。

45. プロモーター DNA が、ヒトまたはマウス由来のプロモーター DNA である、請求項 43 または 44 記載のプロモーター DNA。

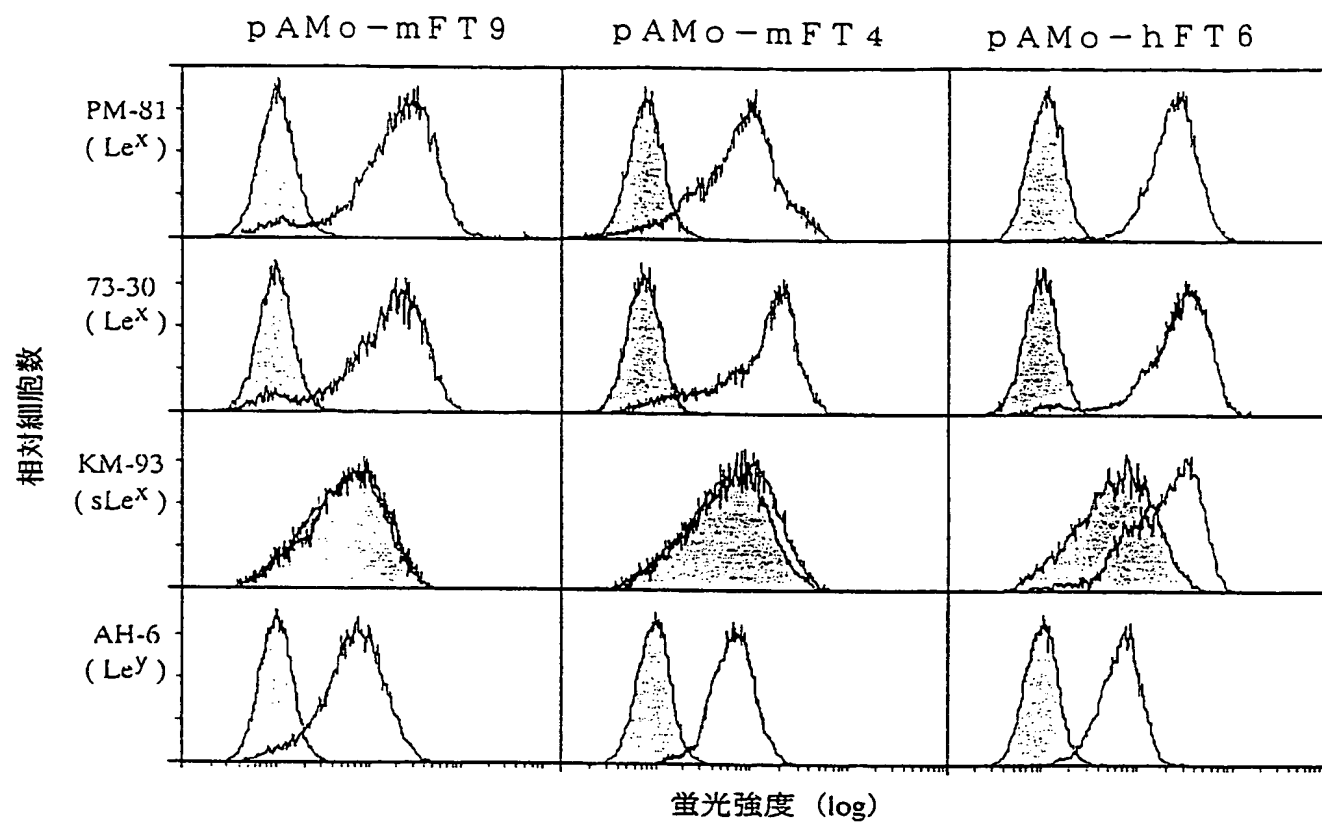
46. 請求項 43、44 および 45 記載のプロモーター DNA から選ばれるプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

47. レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、請求項 46 記載のスクリーニング法。

48. 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA を欠損または変異させたノックアウト非ヒト動物。

49. ノックアウト非ヒト動物がマウスである、請求項 48 記載のノックアウト非ヒト動物。

図 1



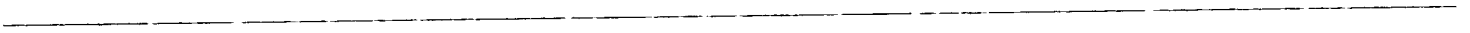
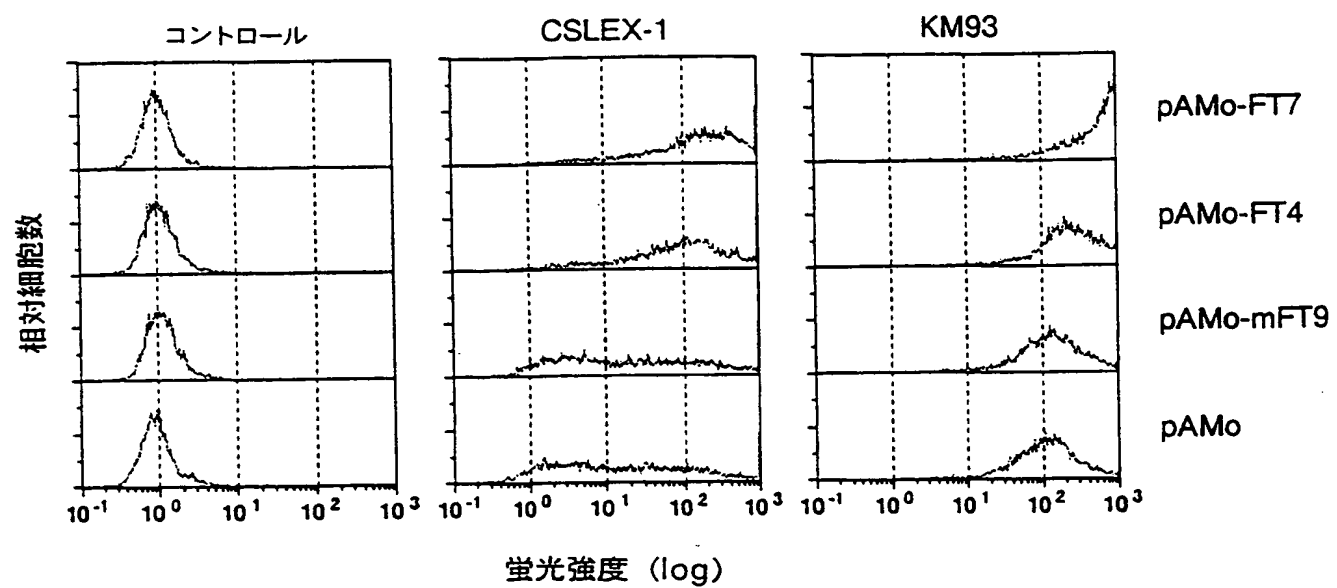


図 2



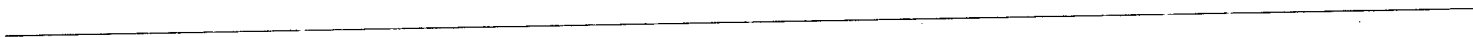


図 3

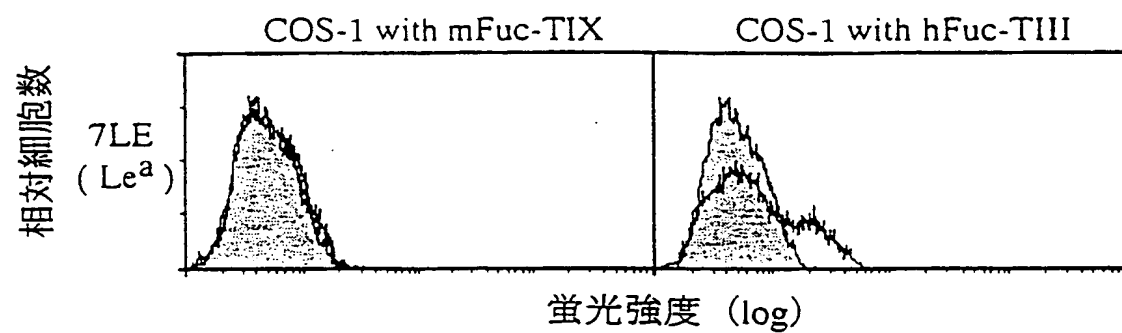




図 4

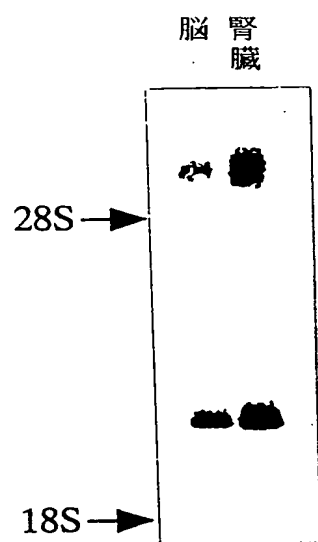




図 5

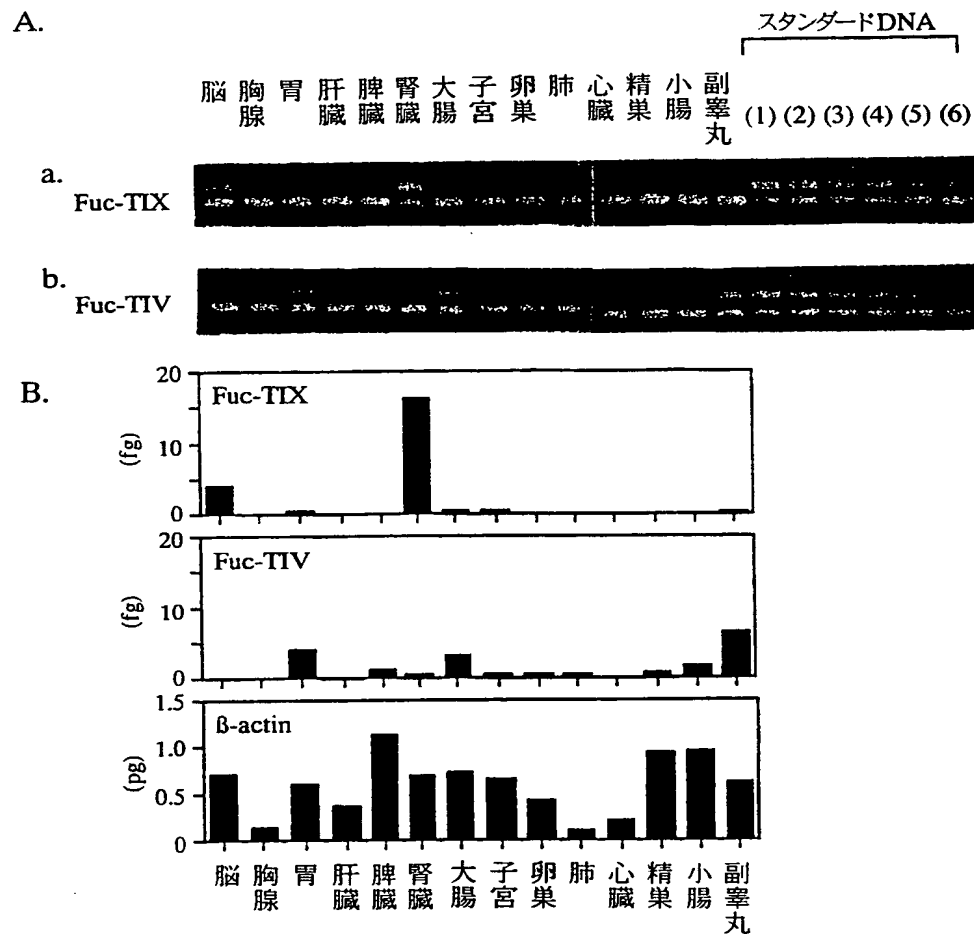
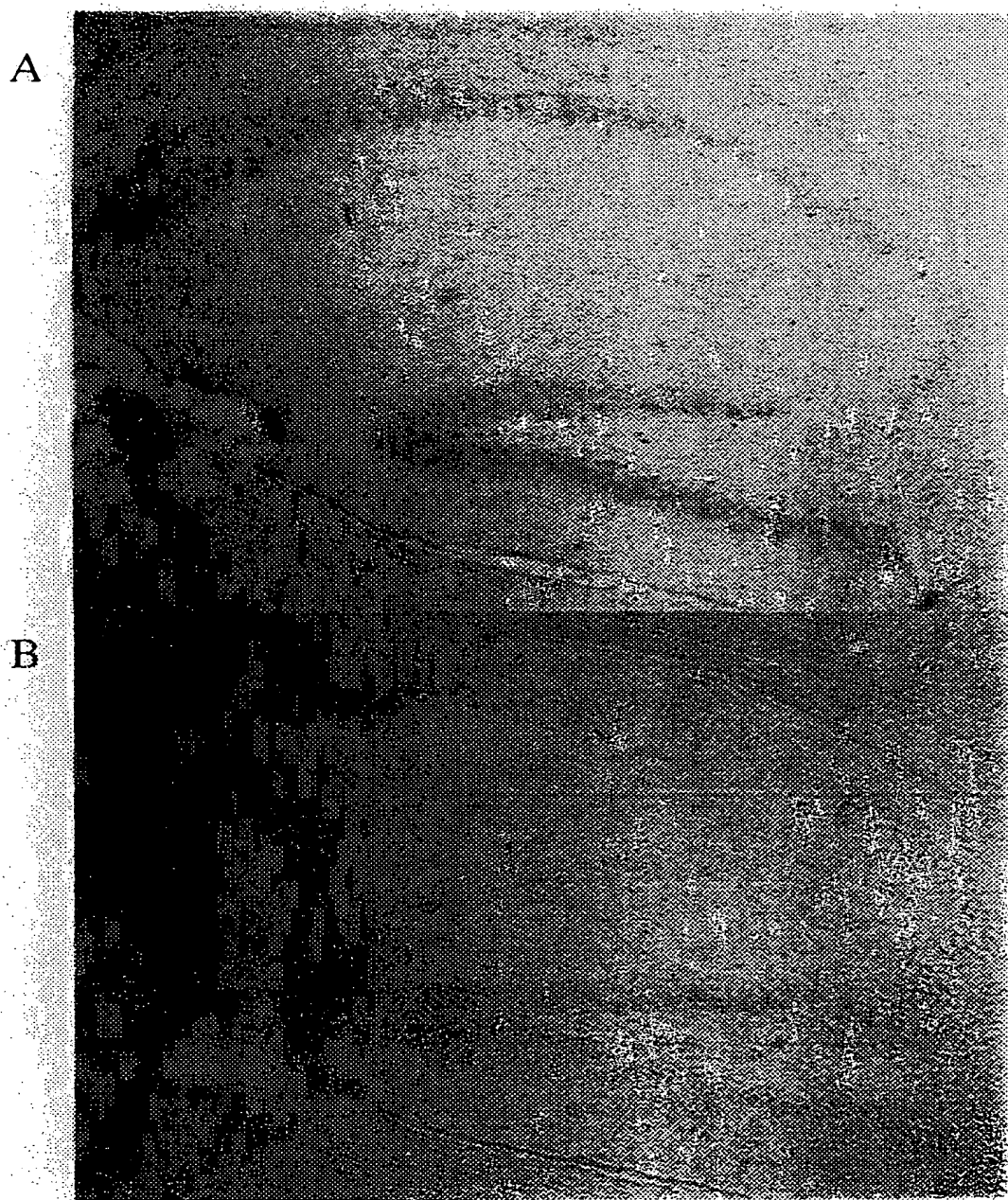




図 6





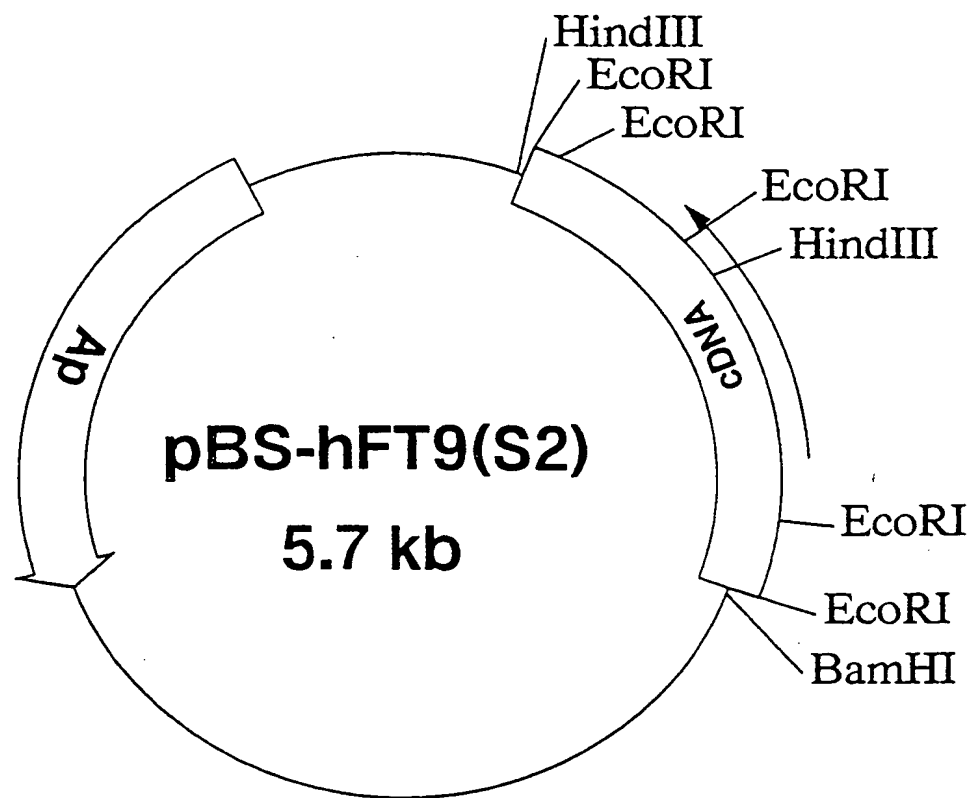
4

4

4

4

図 7





100

100